

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Aislamiento y caracterización de sustancias  
antibacterianas producidas por actinomicetos de suelo**

**- Lima - Perú**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

**AUTOR**

Mirtha Roque Alcarraz

**ASESORES**

Gerardo Gamarra Ballena

Rosa Caballero de Sanchez

Lima – Perú

1998

# UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

*Universidad del Perú, Decana de América*

ESCUELA DE POST - GRADO

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA  
UNIDAD DE POST - GRADO



ASLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS  
PRODUCIDAS POR ACTINOMYCETOS DE SUELO - LIMA - PERU

## TESIS

PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO DE

MAGISTER EN MICROBIOLOGIA

BACHILLER MIRTHA ROQUE ALCARRAZ

LIMA - PERU

1998

*A mis padres:*

*Rodolfo y Olimpia  
quienes con sus sabias enseñanzas,  
cariño, comprensión y ayuda a lo  
largo de mi existencia hacen posible  
el éxito de mi vida profesional.*

*A mis hermanos:*

*Alfredo, Roberto, Miriam y en  
especial a Fernando por su  
ayuda en la culminación del  
presente trabajo.*

*A la Universidad Nacional Mayor  
de San Marcos y a la Facultad  
de Farmacia y Bioquímica, que  
hicieron posible mi formación  
como Magister en Microbiología.*

*Mi agradecimiento al personal  
docente e investigador de los  
Institutos de Microbiología y  
Química Orgánica Aplicada a la  
Farmacia por haberme permitido  
el uso de sus laboratorios  
durante el desarrollo del  
presente trabajo.*



**AL JURADO CONFORMADO:**

**Presidente** : Dra. Luz Oyola de Bardales

**Miembros** : Dr. Antonio Ramírez Vallejos  
Dr. Gerardo Gamarra Ballena  
Dra. Dolores Bazalar Velázquez  
Dra. Luisa Negron Ballarte

**Mi reconocimiento y agradecimiento por la revisión y evaluación del presente trabajo.**

*A mis Asesores:*

*Dr. Gerardo Gamarra Ballena  
Dra. Rosa Caballero de Sánchez  
por su generoso y constante apoyo  
en la realización de este trabajo.*

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
<b>I GENERALIDADES</b>	<b>10</b>
1. <b>LOS ACTINOMYCETOS</b>	
1.1 Morfología y Estructura	10
1.2 Fisiología	23
1.3 Ecología de los <i>Actinomycetos</i>	26
1.4 Taxonomía	29
2. Importancia ecológica de los <i>Actinomycetos</i>	31
3. Obtención de antibióticos a partir de <i>Actinomycetos</i> .	33
 <b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	
1.1 Material Biológico	38
1.2 Descripción de las áreas de muestreo	38
1.3 Colección de muestras de suelo	39
1.4 Pre-tratamiento de las muestras.	39
1.5 Aislamiento de <i>Actinomycetos</i> de suelo.	40
1.6 Selección de cepas de <i>Actinomycetos</i> con actividad Antimicrobiana	41
1.7 Caracterización taxonómica.	45

1.7.1	Análisis morfológico	45
1.7.2	Análisis químico- taxonómico	47
1.7.1	Descomposición de fuentes de Nitrógeno	51
1.7.2	Producción de catalasa	51
1.8	Ensayos químicos preliminares de determinación del metabolito antimicrobiano.	52
<b>III</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>IV</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>69</b>
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>77</b>
<b>VI</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>79</b>
<b>VII</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>80</b>
<b>VIII</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>87</b>

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Instituto de Microbiología "SIMON PEREZ ALVA" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, entre octubre de 1994 y diciembre de 1996.

Se aislaron 100 cepas de Actinomycetos aerobios saprofitos de muestras de suelo colectadas en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM, jardines de Barranco y surco, así como terrenos agrícolas de Supe y Huaral al interior de Lima.

Los cultivos de aislamiento selectivo, previo tratamiento de humedecimiento y secado de las muestras se realizaron en el medio Arginina-Glycerol-Sales (AGS).

De 100 cepas de Actinomycetos aisladas el 53% mostraron actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y negativas.

Los cultivos de 24 cepas bioactivas, en 4 medios de fermentación (A, B, E y F), para la producción de metabolitos secundarios activos, mostraron una variación de la actividad antibacteriana, determinado por el método de difusión en agar, seleccionando al medio F como el óptimo pues las zonas de inhibición presentaron diámetros entre 20-50 mm.

Además, el 75% presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; el 91.66% frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341; el 41,66 5 contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y el 25% a *Escherichia coli* ATCC 25922.

La identificación morfológica y quimiotaxonomica de 12 cepas con mayor actividad antibacteriana permitieron su clasificación dentro del genero *Streptomyces* sp.

Los ensayos químicos preliminares de los metabolitos activos de las cepas CA-25 y CA-93, por cromatografía en capa fina y espectroscopia infrarroja, evidencio la presencia de derivados carbonilicos, amidas, imidas y esterres en ambos casos quedando pendientes los ensayos definitivos de elucidación estructural.

## SUMMARY

The current monograph of search was made at the Microbiology Simon Perez Alva Institute at the Pharmacy and Biochemistry Faculty from San Marcos University since October 1994 until december 1996.

100 saprofitic aerobical Actinomycetes strains were isolated from samples collected in the Botanic Garden of Pharmacy and Biochemistry Faculty UNMSM, Barranco and Surco gardens as well as agriculture fields of Supe and Huaral inside Lima.

Selective isolation was performed in Arginin-Glycerol-Salts media (AGS) and pre-treatment of moistened soil samples were left to dry at room temperature for 3 weeks.

53% from 100 actinomycetes strains isolated displayed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative.

24 bioactive strains culture in 4 fermentation media (A,B,E and F) for active secondary metabolites production showed and antibacterial activity variation determined by Agar Diffusion Test, F media was selectioned as the optimal because the inhibition zones presented a diameter from 20 a 50 mm.

Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 by 75% ; 91,66% against *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and 4166% against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and 25% against *Escherichia coli* ATCC 25922.

Chemotaxonomic and morphological characteristics indicate that 12 strains with high antibacterial activity belongs in the genus *Streptomyces* sp.

Preliminary chemical test of bioactive metabolites from strains CA-25 and CA-93 by thin layer chromatography and infrared spectroscopy detected the presence of carbonilic, amids, imids and esthers in both cases. Structural elucidation definitive test are pendent.

Key Words: Actinomycetes antibiotics

Antibiotics biosynthesis

Antibiotics isolation and purification

Streptomycetes antibiotics



## INTRODUCCION

Desde el descubrimiento de la Penicilina, mucho del esfuerzo de los Programas de Selección de Productos Naturales, ha estado orientado sobre los metabolitos microbianos de origen terrestre (19).

Los compuestos naturales de origen terrestre han sido la fuente más importante de nuevas moléculas activas. Aproximadamente un 50% de los fármacos que hoy en día se comercializan proceden de microorganismos tales, como los *Actinomycetos*, especialmente del genero *Streptomyces* el cual es responsable del 85% de los antibióticos conocidos, los restantes derivan de hongos y otras bacterias (33).

Entre los antibióticos más importantes sintetizados por los *Streptomyces* se encuentran la estreptomicina, el cloranfenicol, la tetraciclina, la eritromicina y la kanamicina entre los principales, además varias especies de este genero producen agentes antivirales, antifungicos, antitumorales y antiparasitarios (19,22, 23, 33).

El descubrimiento de nuevos antibióticos ha permanecido constante, durante los últimos 40 años, se ha invertido mucho esfuerzo y dinero en el desarrollo de medicamentos.

En los Estados Unidos y otros Países desarrollados como Japón y Europa Occidental, durante los años de 1986 a 1991, el numero total de nuevos compuestos aumento en 20%; los antiinfecciosos fueron reducidos en 24%, y los compuestos farmacologicamente activos aumentaron en 87% (19,22,24).

El gran numero de sustancias con propiedades antibacterianas, no

constituye un impedimento para la búsqueda nuevas sustancias producidas por microorganismos, pues aun no hay disponibles antibióticos adecuados para ciertos tipos de cancer o enfermedades virales (19).

Se han realizado numerosas pruebas de sustancias nuevas y semisintéticas por métodos químicos, pero no se ha conseguido avances significativos. De otro lado desde el inicio de la antibioticoterapia hasta la actualidad el número de cepas resistentes ha ido en aumento por el uso indiscriminado de antibacterianos, por lo tanto la única alternativa para superar esta situación es el descubrimiento de nuevas sustancias antibióticas (19, 44, 46).

El desarrollo de Programas para la obtención de nuevos productos con actividades biológicas varias, tiene como una de las prioridades básicas la búsqueda de nuevos grupos de microorganismos a partir de ambientes poco comunes como, suelo, sedimento marino y hábitats fríos (18).

Algunos de los métodos más satisfactorios de búsqueda que están actualmente en uso son producto de la actividad científica japonesa particularmente del grupo Omura, el cual encontró 42 compuestos nuevos con actividad antibacteriana en 1986.

Entre otras investigaciones recientemente realizadas podemos mencionar a P.C. Lee y cols. Que en 1996 obtuvieron ácido clavulámico un inhibidor de la B-lactamasa, utilizando palma, aceite de palma y sus fracciones de oleína y estearina como sustrato en la fermentación por *Streptomyces clavuligerus* (22).

Hacene, H. y cols. En 1994 en Nigeria de un total de 286 especies pertenecientes a 13 géneros de *Streptomyces* demostraron que 32 de ellas tenían

actividad antibiótica contra bacterias, levaduras y hongos (24).

Naruse Nobuaki; Tenmyo Osamu y cols. En 1993 en su búsqueda de metabolitos microbianos con actividad antiviral, encontraron una nueva especie de actinomiceto N°5382-8 aislado de una muestra de suelo colectada cerca del Río Kitsna en la India, el cual produce nuevos antibióticos antivirales, denominados Kistamicinas, que además mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas (28).

Katsuhisa, K., Shigeru, N. y cols. En 1993, aislaron una nueva sustancia antitumoral producida por un Streptomiceto BE-18591, este metabolito también mostró actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (29).

En nuestro país existen escasas investigaciones sobre la búsqueda de nuevas sustancias con actividad antibacteriana de *actinomicetos* aislados de medios terrestres, lo cual motivo a realizar la presente investigación que tuvo los siguientes objetivos:

1. - Aislar, seleccionar e identificar *Actinomicetos* aerobios saprofitos con capacidad para producir sustancias antimicrobianas y que contienen ácido L-Diaminopimelico en sus paredes celulares, procedentes de muestras de suelo de jardines y terrenos agrícolas al interior de Lima.
2. - Seleccionar un medio de cultivo óptimo para la producción de sustancias antimicrobianas por fermentación.

## **I.-GENERALIDADES**

### **1. LOS ACTINOMYCETOS**

Los Actinomycetos son un grupo de microorganismos gram positivos en su mayoría, que tienden a crecer lentamente formando filamentos ramificados, con características similares a las bacterias y los hongos, que están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Ellos se encuentran principalmente en el suelo, en donde juegan un rol importante en la descomposición de la materia orgánica.

Algunas especies causan enfermedades al hombre y los animales. Sin embargo algunos Actinomycetos son considerados de importancia medica e industrial como productores de antibióticos y otros son utilizados industrialmente como agentes de transformaciones químicas (1).

#### **1.1. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA**

##### **1.1.1. COLONIA**

Los Actinomicetos crecen en forma de filamentos rectos u ondulantes, de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, los cuales como resultado de un adecuado crecimiento y ramificación dan lugar a la formación de colonias con una estructura ramificada de filamentos llamada Micelio. El micelio aunque es de dimensiones bacterianas, es análogo a las que forman los hongos filamentosos (2).

Una colonia de actinomycetos no es una acumulación de muchas células individuales y uniformes, sino más bien una masa de filamentos ramificados. Una colonia cultivada sobre un medio sólido

esta integrada, por lo que denominamos micelio vegetativo y micelio aéreo.

Si se forma micelio aéreo, la superficie de la colonia adquiere un aspecto pulverulento y algodonoso, cuando falta este la colonia es lustrosa o mate.

La estructura, la forma, el tamaño y el color de la colonia varían ampliamente según los cambios de las condiciones de cultivo.

Las colonias de los Actinomycetos pueden dividirse en tres tipos:

- A.- Colonias rugosas o lisas que fácilmente pueden ser separadas del medio sólido. Estas son raramente cubiertas con micelio aéreo y usualmente son formadas por Actinomycetos con una fase micelial transitoria.
- B.- El segundo tipo incluye colonias como los de *sporochthya*, las cuales casi no tienen micelio substrato y consisten de hifa aérea adherida al medio a través de grapas.
- C.- El tercer tipo consiste de colonias compactas, usualmente coriáceas que portan hifa aérea y adheridas firmemente al sustrato por la hifa que penetra al substrato. Este tipo de colonias usualmente se encuentra en actinomycetos que tienen una etapa o estado micelial persistente (3).

#### **1.1.2. MICELIO VEGETATIVO**

El micelio vegetativo o micelio substrato esta formado por largas hifas no septadas. Algunas de las hifas son rectas y de una

longitud considerable, superior a 600 u., mientras que otras son mucho más cortas ramificadas y curvas.

El ancho del micelio vegetativo usualmente varia desde 0.5 hasta 1.5 um. La ramificación del micelio es típicamente monopodica, en la mayoría de especies de Actinomycetos a excepción de las especies de *Actinobifida* que presentan una ramificación dicotoma, mientras las especies del genero *Streptoverticillum* presentan una ramificación verticilada de sus hifas aéreas esporogenas (3).

El micelio vegetativo se fragmenta en elementos bacilares o cocoidales en el caso de los Actinomicetaceas y de las Dermatofiliaceas, pero no en el de Streptomicetaceas.

El micelio vegetativo puede teñirse por los procedimientos ordinarios de tincion.

El citoplasma de las células de las hifas es al principio homogéneo, y sé vacualizando a medida que llega a fases más tardías de desarrollo.

Con frecuencia el micelio vegetativo presenta una coloración característica crema, amarilla, anaranjada, verde, parda o negra, estos pigmentos cuando son hidrosolubles pasan al medio.

Un estudio de *Streptomyces griseus*, concluye que el micelio vegetativo puede ser considerado aeróbico facultativo.

### **1.1.3. MICELIO AEREO**

El micelio aéreo en cuanto a estructura y forma, es mucho

más característico que el micelio vegetativo.

El micelio aéreo se origina a partir del micelio vegetativo y puede cubrir la totalidad de la colonia, confiriéndole un aspecto algodonoso o pulverulento, este es ligeramente más grueso que el vegetativo, usualmente tiene un pigmento insoluble oscuro asociado con su envoltura externa y parece gris a la luz reflejada.

A diferencia del micelio vegetativo muestra menor tendencia a ramificar y penetrar al substrato, forma esporas mediante fragmentación y la capa es hidrofóbica (3).

El micelio aéreo puede ser fértil o estéril, en algunos casos, el micelio estéril se presenta en forma de manchas blancas sobre los cultivos con micelio aéreo. Sin embargo el micelio fértil de color normalmente gris y se denomina también micelio aéreo secundario. (4).

En general las hifas estériles son finas y no presentan aumento en su diámetro, mientras que las hifas esporógenas son al principio más finas que las hifas de las cuales se originan, pero más tarde en las últimas fases de su desarrollo aumentan su espesor.

El micelio fértil está formado por esporóforos que se disponen sobre filamentos estériles.

Los esporóforos de *Streptomyces* pueden ser largos o cortos, rectos o más o menos curvos. Las hifas cortas confieren a la superficie de la colonia un aspecto pulverulento, mientras que una superficie de

aspecto algodonoso es debida a la presencia de hifas largas.

Los esporoforos pueden adquirir forma recta o flexuosa, o presentar espirales abiertas o cerradas, pueden disponerse en forma verticilada como ocurre en algunas especies de *Streptomyces*.

La estructura específica del micelio aéreo es consistente y característica para cada especie de *Streptomyces* en condiciones convenientemente estandarizadas, por lo cual este carácter del micelio aéreo se emplea como un buen criterio taxonómico (5). Otro carácter del micelio aéreo de *Streptomyces* es la pigmentación, que varia del blanco o gris al amarillo, anaranjado, rosa, lila pálido, azul y verde.

Cuando las hifas esporogenas están agrupadas, adoptan un aspecto parecido al de los coremios de los hongos.

En los experimentos de respirometria de Erikson y Webley, se concluyo que el micelio aéreo es aeróbico debido a que las células miceliales aéreas demostraron tener una respiración a velocidad mayor que las células miceliales de la parte profunda o la base de un cultivo líquido.

#### **1.1.4. ESTRUCTURA CELULAR**

La estructura de las células de actinomicetos es similar al de las bacterias gram positivas. La formación de septos transversos es observada frecuentemente en las hifas que forman el micelio de todos los Actinomicetos y se piensa que estos son formados de manera análoga al septo formado por las bacterias gram positivas (6).



El septo en la hifa vegetativa de la mayoría de Actinomicetos estudiados, puede poseer una capa única

O triple. Se ha sugerido que la falla de la hifa septada de *Sterptomyces* para separarse en fragmentos puede ser debido a deficiencias locales en la actividad de sus enzimas líticas desencadenantes del proceso de septación. (3).

Los septos transversos en crecimiento en las hifas en fragmentación de *Nocardia* son divididos longitudinalmente, iniciándose el proceso desde los extremos adyacentes a las paredes de la hifa. Citológicamente, el proceso de la septación de *Nocardia* es reminiscente al de *Arthrobacter crystallopoietis*. Sin embargo, las observaciones al microscopio de luz resaltan la posible existencia de varios modos de fragmentación.

Además de las estructuras intracelulares indispensables y siempre presentes, uno encuentra en las hifas de los Actinomycetos algunos elementos variables, así como algunas estructuras raras e inusuales. Como en otros procariotes, estos componentes pueden encontrarse encerrados dentro de sacos membranosos o estar libres en el citoplasma, formando varias inclusiones, también se ha observado que las células carecen de membrana nuclear, y mitocondrias (7).

La localización de polisacaridos, polifosfatos, y lípidos fue demostrada por medios citoquímicos, mientras que la presencia del

ácido poli-beta-hidroxibutírico puede ser inferido a partir de las determinaciones químicas. Las vacuolas en las paredes de los Actinomicetos pueden tener configuraciones ampliamente diferentes, algunas son muy similares a las vacuolas gaseosas en otras bacterias.

La pared celular de los actinomicetos, contiene ácido murámico y ácido diaminopimélico (lisina en algunas especies), característicos de la pared bacteriana y han perdido la quitina y los glucanos, característicos de la pared celular de los hongos (5).

Estructuras tipo bastón y tubulares reminiscentes de rafidosomas, virus, o partículas fágicas defectuosas, así como regiones transparentes al microscopio electrónico de configuración irregular sin membrana, han sido vistas frecuentemente en el citoplasma de las higas en el estadio de idiofase en cultivos de *Streptomyces*, la formación de estas estructuras, esta ligado con la autólisis, acumulación de antibióticos, o infección por fagos (3).

Los Actinomicetos comparten con los hongos no solamente la organización micelial, sino también los rasgos estructurales que podrían resultar de esto, así se tiene la hifa intrahifal encontrada en *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini*, *Micropolyspora* sp. Y *Microlobosporia flavea*.

Como en los hongos, la hifa intrahifal en los Actinomicetos se encuentra no solo en cultivos en envejecimiento, sino que se piensa que asume un rol importante en la reproducción de células congeladas

de *Frankia* sp (6).

La movilidad de las células de Actinomycetos, si es que son especializadas como las zoosporas o no especializadas como fragmentos miceliales, esta siempre ligado con la posesión de flagelo, y todos los tipos de flagelo han sido encontrados, siendo los flagelos peritricos los más raros.

En *Actinoplanes* sp. El flagelo es reminiscente de *Pseudomonas*, mientras que los flagelos de *Dermatophylus congolensis* fueron diferentes en el espesor(8-9 um), mucho menor respecto que la mayoría de flagelos (3).

#### **1.1.5. ESTRUCTURAS AMICELIALES**

Algunos Actinomycetos forman estructuras que emergen de las células miceliales pero difieren marcadamente de ellas.

El rol de estas estructuras en la reproducción no es muy clara.

La esclerotia formada persistentemente por *Chainia* sp. Pertenece a esta categoría. En la formación de la esclerotia, la hifa micelial engrosada se vuelve septada, y se forman vacuolas conteniendo lípidos, así como material cementante intercelular, el cual contiene ácido L-2,3-diaminopropionico.

Los lípidos son principalmente trigliceridos de ácidos grasos ramificados de las series iso conteniendo 15 a 16 carbonos. Estas células transformadas y aplanadas son empacadas en rejillas hifales. Se piensa que la función de la esclerotia es reminiscente de aquellos

hongos como *Sclerotium rolfsii* y *Verticillium alboartrum* (3).

Los agregados hifales formados por ciertos *Streptomyces sp.* Sobre algunos medios probablemente no están relacionados con la esclerotia, tampoco son los gránulos descritos por Baldacci y colaboradores. Una característica de estos gránulos es que ellos producen después de inoculación en medio fresco colonias de Actinomicetos que podrían diferir de las colonias madres en la capacidad para producir micelio aéreo y pigmentos. (7).

Asociaciones cerradas de hifas se encuentran en Coremia, producido por algunos *Streptomyces sp.* Algunos Actinomicetos excretan sustancias limosas, las cuales pueden contribuir a la formación de aglomerados celulares, enriquecidos con hidróxido férrico. El glicolípido específico cera D producido por algunas micobacterias contiene componentes comunes a la mureina de la pared, el cubrir las células con la cera D probablemente ofrece protección adicional. Estudios inmunoquímicos indican la excreción de complejos de membrana, consistente de mucopolisacaridos y un fosfolípido, durante el crecimiento de *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Dermatophili* y Streptomicetos.

Los gránulos de azufre formados por *Actinomyces sp.* In vivo consisten de hifas miceliales cementadas con un complejo proteína - polisacarido. La porción mineral de los gránulos incluye apatita y fosfatos de calcio. (3).

### 1.1.6. ESPORAS

Muchos de los Actinomicetos del suelo producen sobre sus hifas esporas asexuales, conocidas como conidias, aisladas, en pares o formando cadenas, mientras que unos pocos producen sus esporas en una estructura especializada conocida como esporangio.

Las características de las esporas producidas por los Actinomicetos y la diversidad estructural que ellas exhiben caen dentro de la amplia definición de una espora, la formación de estas estructuras puede representar los medios principales de reproducción de los Actinomicetos (7).

Las esporas formadas por los Actinomicetos se dividen en dos grupos de acuerdo a su formación:

**A.ENDOGENAS:** son esporas termoresistentes, que se forman dentro del citoplasma de la hifa madre; este tipo de esporas es característico de los Actinomicetos termofilicos.

Estructuralmente las esporas endogenas siguen la misma secuencia de formación que las esporas de otras bacterias gram positivas, aunque se diferencian en su localización final sobre el micelio. Estas esporas casi siempre residen en la hifa y son parcialmente expulsadas en el curso de su formación y maduración.

Las esporas formadas como esporangio, son liberadas tan pronto como la pared esporangial se rompe.

**B.EXOGENAS:** En la mayoría de Actinomicetos se forman las

esporas exógenamente, la cual empieza por la división de los nucleoides y cambios en las estructuras de su membrana, tales como el engrosamiento de la membrana plasmática periférica, la aparición de un número de mesosomas. Mas tarde empieza a formarse el septo de esporulación acompañado por los mesosomas. (3).

El desarrollo de la pared de la exospora parece ser formada con la ayuda de la membrana citoplasmática de la hifa (en contraste con la formación de la espora endógena), donde la pared de esta última subsecuentemente se transforma en la pared de la espora; aun cuando parece ser que la pared de la espora o por lo menos sus capas internas son sintetizada en la membrana plasmática. (7).

En *Streptomyces sp.* Y algunos Actinomycetos formadores de esporangio, el septo parece ser formado en dos etapas. Primero, el esporoforo es deparado por un septo simple desde la hifa correspondiente, luego la hifa esporógena es dividida por un número de septos casi simultáneamente en células de igual tamaño que eventualmente es transformado en esporas.

**ESTRUCTURA.-** Las diferencias estructurales entre las endo y exoesporas son pronunciadas.

Las endoesporas producidas por Actinomycetos termófilicos son prominentes entre las esporas de Actinomycetos, debido a sus

contornos poligonales sobre las superficies más externas.

La estructura interna de las endoesporas es muy similar al de las esporas de *Bacillus* y *Clostridium* sp. , Porque tienen una corteza y un sistema elaborado de cubiertas externas.

Las exoesporas muestran una gran diversidad de estructura, así se pueden distinguir los siguientes tipos principales:

- A.** Esporas sin estructuras internas nuevas, dentro de esta categoría están las esporas de *Streptomyces* sp. Y varios otros actinomicetos, los cuales forman cadenas de esporas y vesículas de esporas (8). En ellas no se observa diferencias en el nucleóide, ribosomas, estructura de la membrana y vacuolas de las células vegetativas. Sin embargo, los componentes esporales parecen empacados mas densamente siendo reducido él numero de mesosomas. Usualmente la pared de la espora es de 1.5 a 2.0 veces más gruesa que la pared vegetativa.
- B.** Esporas sin estructuras ausentes en las células vegetativas, estas estructuras pueden estar representadas por vacuolas grandes y una estructura de origen desconocido llamada cuerpo central. La vaina superficial, la cual cubre el micelio aéreo de muchos Actinomicetos, usualmente persiste en las esporas.

La presencia de estructuras ornamentales y apéndices en estas esporas fisiológicamente aun no se han estudiado, pero se cree que intervienen en hidrofobicidad y la capacidad de flotación

de las esporas y mejoría de la diseminación por los insectos.

**COMPOSICION.-** La composición química de las esporas de Actinomycetos es fragmentaria en comparación con la de las esporas bacterianas y algunas esporas fungicas. Los estudios realizados en las esporas de *Streptomyces sp.* Han permitido establecer que la cantidad de agua varia ampliamente en función de las condiciones ambientales en 2-4-% siendo denominada como agua firmemente fijada (8). Las esporas termofilicas evidencian cantidades aumentadas de Ca, de Mg, Mn y Ni. Hay una posibilidad que el Mn este presente al estado libre y fijado al complejo ácido dipicolinico-Mn de manera similar a aquel de las esporas bacterianas. Sin embargo de acuerdo a los análisis convencionales, el DPA no ha sido encontrado en las esporas de ningún *Streptomyces* examinado hasta ahora.

Al contrario, las endosporas de actinomicetos termofilos si presentaron cantidades de DPA y calcio similares a las esporas de otras bacterias. El contenido de DNA se incrementa respecto al de RNA respecto a lo observado en las células vegetativas. La cantidad de proteína en las esporas maduras alcanza 10 a 15%, los ribosomas de la espora son más estables que los de la célula vegetativa. Los componentes de mureina de la espora y de la célula vegetativa en *Streptomyces* parece no diferir significativamente.

Durante la esporulacion, algunos actinomycetos excretan y acumulan en sus cultivos sustancias limosas que podrían sostener la



hifa esporulante juntos y de alguna manera modificar la apariencia de los esporoforos (9).

**FUNCION.**- La actividad metabólica de las esporas secas e intactas de *Streptomyces* es baja, como se demuestra por experimentos de respirometría. La duración máxima de la viabilidad de las esporas sobreviviendo en lagos a 5 -6°C es de 100 a 1500 años.

El valor máximo para el mantenimiento de la viabilidad de las esporas de *Streptomyces* secadas al aire hasta ahora reportado es de 14 años (7).

La mayoría de esporas de Actinomicetos estudiados comparten una resistencia alta a la desecación, esto puede ser responsable por lo menos en parte, para la abundancia relativa de Actinomicetos en suelos áridos.

Las esporas de *Streptomyces* parecen ser más resistentes a la abrasión mecánica, ácidos diluidos, formalina, peróxido de hidrógeno y algunos alcoholes, probablemente fenol y cloroformo.

## 1.2. FISILOGIA

### 1.2.1. CICLO DE VIDA

Los eventos del desarrollo en actinomicetos, como en otros microorganismos, se manifiestan mas completamente en el curso de sus ciclos de reproducción. Un número de microorganismos pertenecientes a Actinomycetales y grupos relacionados no forman

células reproductoras especializadas.

La reproducción vegetativa en estos microorganismos es alcanzada por septación celular y gemación.

Junto con la septación, se reportó que *Actinomyces sp.* era capaz de reproducirse por gemación (3).

La fragmentación micelial puede ser considerada como una forma especial de reproducción vegetativa. Es observado en muchos Actinomicetos como los del género *Nocardia* en el cual la fragmentación comprende la formación de septos múltiples que dividen las hifas crecientes en elementos mas o menos regulares. (3).

Las células separadas frecuentemente son flageladas, móviles algunas veces llamadas zoosporas.

Los Actinomicetos que retienen micelio no fragmentado durante largos periodos de su ciclo de vida usualmente se reproducen por formación de esporas sexuales.

Las esporas pueden ser formadas sobre el sustrato y/o micelio aéreo como células simples; en cadenas de varias longitudes o como vesículas especiales llamadas esporangios y que pueden ser dotadas de flagelo (9).

Las especies de Actinomicetos, al igual que los hongos, son frecuentemente dotados con mas de una ruta reproductora potencial. Ya se ha hecho mención a la capacidad para reproducirse por fragmentación micelial y esporulación. La unidad reproductora

adicional es algunas veces diferente del fragmento simple del micelio.

Los *Streptomyces* sp. Tienen la capacidad para formar algunas células especializadas junto con conidios aéreos sobre el micelio substrato, las cuales son llamadas clamidosporas o artrosporas (5).

La Actinoplanes tienen la capacidad para formar dos tipos de esporas: zoosporas móviles flageladas en periférico en esporangio sobre el micelio aéreo y cadenas de artrosporas tipo *Streptomyces* sobre el micelio aéreo.

### **1.2.2. METABOLISMO**

La nutrición de los Actinomicetos es bastante versátil. Los requerimientos del factor de crecimiento son poco frecuentes y una amplia variedad de fuentes de carbono como carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos pueden ser utilizados por ellos.

#### **METABOLISMO DEL CARBONO**

Los Actinomicetos utilizan una gran variedad de compuestos orgánicos tales como los azúcares, almidón, hemicelulosas, proteínas y diversos compuestos que no-se metabolizan fácilmente. Las mejores fuentes de carbono son la glucosa, la maltosa, la dextrina, el almidón, la glicerina y las proteínas.

La utilización, por parte de diversas especies de

*Streptomyces* de algunos glucidos es tan especifica, que esta especificidad puede emplearse para la diferenciación de especies (5). En condiciones especiales de fermentación se forman diversos ácidos.

#### METABOLISMO DEL NITROGENO

Las sales de amonio son en general preferido, frente a los nitratos, como fuente de nitrógeno mineral. Algunas especies emplean nitrito y carbamatos. Tanto la nitrificación como la reducción de los nitratos es una característica de algunos *Streptomyces*. Las mejores fuentes de nitrógeno para los actinomicetos son las proteínas, las peptonas y algunos aminoácidos. *Streptomyces* posee una actividad proteolítica más intensa que *Nocardia*. (10).

#### METABOLISMO DE ELEMENTOS MINERALES

Los actinomicetos necesitan un medio nutritivo bien equilibrado en lo que se refiere a su composición mineral. Una proporción suficiente de K, Mg, Zn, Fe, Cu y Ca es en general necesario para el crecimiento y el metabolismo, de los actinomicetos. Esto puede variar según el efecto que se quiera obtener, por ejemplo en la producción de diversos antibióticos o favorecer la esporulación. En *Streptomyces* el cobalto favorece la esporulación (11).

#### METABOLISMO DE VITAMINAS, PIGMENTOS Y

## ANTIBIOTICOS

Los actinomicetos producen muchas vitaminas, pigmentos y antibióticos, en algunos casos con tal intensidad que esta propiedad tiene aplicación industrial. Esto es especialmente cierto para la vitamina B12 que es un subproducto de la fermentación de aureomicina por *Streptomyces griseus*.

Un cierto numero de actinomicetos sintetizan una gran variedad de pigmentos. Los pigmentos se distinguen entre sí por su solubilidad en agua o en disolventes orgánicos. La función y el papel de los pigmentos en la vida y el metabolismo de los Actinomicetos no son aun bien conocidos. Algunos pigmentos, especialmente los de estructura quinoide, pueden ser considerados como precursores de ácidos húmicos, mientras que otros exhiben un efecto mas o menos intensamente antibiótico.

### 1.4. ECOLOGIA DE LOS ACTINOMYCETOS

Los Actinomicetos están ampliamente distribuidos, en el suelo así como en una variedad de hábitats diferentes, incluyendo estiércol; fango de los ríos y el fondo de los lagos, en el agua en tejidos vivos del hombre y de diversos animales y en la atmósfera. Se encuentran en la superficie del suelo así como en los horizontes inferiores, a profundidades considerables. Muchos son saprofitos estrictos, pero algunos forman asociaciones mutualistas o parasitarias con plantas y animales. (11).

Los Actinomycetos existen en su hábitat natural en estados metabólicamente activos o relativamente **inactivos, bajo la forma de conidias o de hifas vegetativas.**

En algunos géneros, estos estados pueden ser distinguidos por las diferencias morfológicas entre las propagulas en reposo respecto de las activas.

El tamaño de la comunidad depende del tipo de suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente.

Las estimaciones por cuenta en placa proporcionan valores que varían de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> por gramo en zonas templadas, pero se han encontrado cifras inferiores en regiones de la Antártida, turberas ácidas, tundras y suelos inundados: las cifras que exceden 100 millones se han hallado solo ocasionalmente.

Tanto en terreno virgen como en terreno cultivado, los actinomycetos constituyen del 10 al 50 de la comunidad total, determinado por el método de placa.

En áreas alcalinas, y especialmente cuando hay sequedad, la abundancia relativa es alta (12).

Los Actinomycetos son menos comunes en áreas húmedas que en áreas secas, la población es mayor en pastizales y en suelos de pastoreo que en suelos cultivados y la abundancia en campos de cultivo con frecuencia sobrepasa la de los sitios vírgenes adyacentes. Sin embargo son

desfavorables las turberas, las áreas inundadas y los ambientes cuyo pH es menor de 5.0.

Los suelos en regiones climáticas cálidas son más favorables para una extensa flora de Actinomycetos que los de áreas mas frías; el tamaño de la comunidad en latitudes templadas tiende a aumentar conforme se acerca a los trópicos. Consecuentemente el número total y el porcentaje de incidencia de los Actinomycetos en el hemisferio norte aumenta de norte a sur

(Tabla 3.1). En términos cualitativos y cuantitativos, la flora de Actinomycetos esta regulada por el hábitat que la rodea. La etapa del ciclo de vida que predomina, el tamaño de la comunidad, sus transformaciones bioquímicas y los géneros y especies que encontramos, están determinados por las fuerzas que actúan en el ecosistema. Para los actinomycetos, el status de materia orgánica, pH, humedad y temperatura son los determinantes ecológicos principales. (11).

Como grupo, estos microorganismos requieren niveles de pH comprendidos entre 5-9 con una neutralidad cercana a la optima y son particularmente sensibles a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y bajas concentraciones de O<sub>2</sub>. El contenido de humedad es otro determinante ambiental critico; en condiciones de inundación o en lugares donde la humedad esta por encima del optimo microbiologico (85-100%) de capacidad de retención de agua, estos microorganismos están ausentes.

En general, dejando de lado algunas excepciones, podemos afirmar que la

mayoría de los Actinomycetos son organismos del suelo. Sin embargo algunas estirpes de *Streptomyces*, *Micromonosporas* y *Actinoplanes* han sido observadas de modo ocasional viviendo en agua dulce o salada.

La mayoría de los Actinomycetos son aeróbicos, excepto los del genero *Actinomyces*, que son anaerobios o microaerofilicos, y provocan las diversas actinomicosis del hombre y del ganado.

### 1.3. TAXONOMIA Y NOMENCLATURA

Hasta hoy se sabe, que los Actinomycetos son bacterias gram positivas, con una alta cantidad de guanina (G) mas citocina (C) en su ADN (>55 % mol), los cuales están filogeneticamente relacionados en la evidencia de los estudios ribosomales 16S(r) y el ADN: ARNr pareados.

Las siguientes características biológicas fundamentales permiten la clasificación de los Actinomycetos entre las bacterias.

1. Son procarioticos (carecen de membrana nuclear).
2. El diámetro de sus filamentos es de 1 u o menos, más pequeños que las células de levaduras y muchos más estrechos que las características estructurales hifas de los mohos.
3. Sus paredes celulares contienen ácido muramico y Acido diaminopimelico (lisina en algunas especies); característicos de la pared bacteriana, y han perdido la quitina, los glucanos, característicos de la pared celular de los mohos y hongos.
4. Su crecimiento se inhibe por las penicilinas, tetraciclinas, sulfamidas y otros medicamentos bacterianos.



5. No son sensibles a los antibióticos polienicos que poseen una intensa acción fungicida.

El grupo abarca géneros con una morfología muy variada tal como la de cocos (*Micrococcos*), cocos en forma de varilla (*Arthrobacter*), fragmentos en forma de hifas (*Nocardia*, *Rhotia*), géneros con un micelio permanente y altamente diferenciado (*Micromonospora*, *Streptomyces*). Algunos géneros forman esporas que van de zoósporas móviles a propagules especializadas (13).

La taxonomía de los Actinomycetos requiere la aplicación de criterios morfológicos, culturales, fisiológicos y químicos (13). , Así como las características de las esporas.

En 1970, Lechevalier, M y col. (14), reportan el estudio de la composición química de la pared celular como un criterio para la clasificación de Actinomycetos aeróbicos basados en los principales componentes hallados en preparaciones de pared celular y en hidrolizados de células enteras de mas de 600 cepas de Actinomycetos. Los resultados muestran que tanto el patrón de azúcares y la configuración del ácido diamino-pimelico presentes en la pared celular, constituyen criterios que permiten la separación de Actinomycetos en 6 grupos taxonómicos útiles (Anexo Cuadro N°1 y N 2).

Posteriormente Stanek y Roberts (1974) (15) reportan una técnica simplificada para la identificación de Actinomycetos aeróbicos por cromatografía en capa fina basado en la hidrólisis de células enteras para

determinar los isómeros del Acido diamino-pimelico presentes en la pared celular y en la capacidad de los organismos para descomponer la caseína, tirosina y xantina.

La nomenclatura actual para este tipo de microorganismos se basa en los hallazgos recientes y en los resúmenes transcritos de la sección 17 del Manual de Bergey y se encuentran en el International Journal of Systemic Bacteriology, vol. 30, 1980. ( Anexo Cuadro N 3 y N 4)

## **2. IMPORTANCIA ECOLOGICA DE LOS ACTINOMYCETOS**

El reservorio natural de los Actinomycetos aeróbicos es el suelo, donde su rol ecológico principal parece ser la descomposición de la materia orgánica (16).

Hay evidencias de que estos microorganismos participan en los siguientes procesos:

- a) Descomposición de algunos de los componentes resistentes de tejidos vegetales y animales. Los Actinomicetos no responden inmediatamente a la adición de materiales carbonados naturales sino varias semanas después, lo que indica que se desarrollan escasamente en competencia con bacterias y hongos durante el periodo en que se encuentran carbohidratos simples.
- b) Formación de humus mediante la transformación de restos vegetales y del lecho de hojas en los compuestos naturales de la porción orgánica del suelo. Muchas cepas en medios de cultivo pueden producir el tipo de moléculas complejas que supone son importantes en la fracción de humus de los suelos minerales.
- c) Transformaciones a temperaturas elevadas, particularmente en abonos

verdes calientes y en putrefacción, paja acumulaciones de abono y estiércol.

En estas condiciones los actinomicetos termofilicos pueden ser el grupo predominante, a veces al grado que la superficie del montón de abono adquiere el color blanco o gris característico de este grupo. En este sitio, los *Thermoactinomyces*, algunos estreptomicetos y especies de las bacterias que forman esporas tienen ventajas competitivas.

**D)** Provocan algunas enfermedades de las plantas, por ejemplo la roña de la papa y la viruela de los camotes, cuyos agentes causales son *Streptomyces scabies* y *S. ipomoevae*, respectivamente.

**e)** Causan infecciones en animales y seres humanos, por ejemplo *Nocardia asteroides* y *N. otitidis-caviarum*.

**f)** Son de posible importancia en el antagonismo microbiano y en la regulación de la composición de la comunidad del suelo. Esta función en el ecosistema puede ser consecuencia de la capacidad de muchos actinomicetos para excretar antibióticos y a su capacidad de producir enzimas que provocan la lisis de hongos y bacterias. En este aspecto son dignas de atención las observaciones de que tratamientos de un suelo con una sustancia como la quitina favorece el desarrollo de las hifas de los actinomicetos produciendo algunas veces una notable eliminación de hongos que provocan enfermedades a las plantas superiores.

### **3. OBTENCION DE ANTIBIOTICOS A PARTIR DE ACTINOMICETOS**

La producción industrial de la penicilina fue seguida de una búsqueda generalizada de nuevos organismos productores de antibióticos. Waksman y su

grupo, iniciaron un estudio exhaustivo de la flora microbiana del suelo, aislando en forma cristalina un nuevo antibiótico producido por un actinomiceto, la actinomicina (Waksman y Woodruff, (1940) (17). Posteriormente, en 1944, fue descubierto un nuevo antibiótico, producido por *Streptomyces griseus*, la estreptomicina, aminoglicosido cuya utilización terapéutica provoco una autentica revolución en el tratamiento de la tuberculosis. En años sucesivos se aislaron nuevos antibióticos, entre ellos el cloranfenicol, las tetraciclina, antibióticos del grupo de los macrolidos, entre ellos la eritromicina. Asimismo se aislaron nuevos antibióticos del grupo de los B-lactámicos, cefalosporinas y nuevos antibióticos pertenecientes a la familia de los aminoglicosidos.

La producción de antibióticos por microorganismos es un fenómeno muy frecuente y una gran variedad de microorganismos producen antibióticos que actúan contra otros.

Los Actinomycetos aeróbicos saprofitos se mantienen como la mejor fuente de productos naturales nuevos terapéuticamente importantes derivados por fermentación, siendo notables metabolitos o, moléculas orgánicas complejas con diversas actividades biológicas dentro de las cuales encontramos un gran numero y variedad de antibióticos (10).

Martín Liras y Aguilar (1986) (18) reportan que la mayor parte de los antibióticos descubiertos entre 1950 y 1980 son producido por Actinomycetos, en particular por miembros del genero *Streptomyces*, habiéndose descrito hasta el momento mas de 700 especies de *Streptomyces*. Además reportan que aproximadamente el 70% de los antibióticos de importancia comercial son

producidos por especies del genero *Streptomyces*.

En los últimos años el descubrimiento de nuevas sustancias antimicrobianas incluye actinomicetos no solo de fuentes terrestre sino principalmente actinomicetos aislados de ambientes marinos (19).

El Programa de búsqueda de nuevos productos naturales se ha centrado en el aislamiento de Actinomicetos aeróbicos que contienen ácido meso-diaminopimelico en sus paredes celulares (16,20) por cuanto se sabe que los Actinomicetos son productores de mas del 70% de los antibióticos aislados hasta el presente, con relación al 20% correspondiente a los hongos y el 10% restante a las eubacterias (19).

Si bien el genero de Streptomicetos constituyen el grupo principal de actinomicetos productores de antibióticos, el grupo de *Micromonosporae* es el segundo gran grupo de importancia con esta capacidad y ha sido crucial para el éxito del Programa de Productos Naturales de Schering-Plough (21).

P.C.Lee y col. (1996) (22) en Kuala Lumpur, Malasia obtuvieron ácido clavulamico un inhibidor de la b-lactamasa, utilizando palma, aceite de palma y sus fracciones de oleína y esterarina, como principal fuente de carbono para el crecimiento y producción de ácido clavulamico por *Streptomyces clavuligerus*, que produce también la Cefamicina C.

Ubukata, M y col. (1995) (23) En el Instituto de Investigación Física y Química en Japón a partir de un extracto del micelio en acetona aislaron 3 nuevos antibióticos macrolidos producidos por el genero *Sterptomyces*

*violaceus*. Tales antibióticos mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram+ y hongos.

Hacene, H. y col. (1994) (24) En Nigeria de un total de 286 especies pertenecientes a 13 géneros de *Streptomyces*, demostraron que 32 de ellas tenían actividad antibiótica contra bacterias levaduras y hongos. Las características del espectro UV revelaron que 6 especies produjeron sustancias antifúngicas no polienicas y cuatro sintetizaron sustancias polienicas.

Fiedler, H. y col (1994) (25) En la Universidad de Tubigen, Alemania a partir de un filtrado de cultivo de *Streptomyces tendae* obtuvieron un antibiótico del tipo juglomycin, con actividad frente a bacterias Gram+ y Gram-, así como levaduras.

Bernan y col. (1994) (26, 27) En el Natural Products Research Section-Cynamid Company USA) aislaron una cepa de Actinomyceto designada como *Streptomyces* sp. LL-31F508 de una muestra de sedimento marino de Florida. Esta cepa mostró una excelente actividad contra *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

Una serie de nuevos antibióticos llamados Bioxalomycinas fueron identificados como los productos de fermentación

De la cepa aislada. Asimismo posteriormente aislaron un Actinomyceto del suelo de Pomeroy, Washington designado como LL-d37187 al cual denominaron *Streptomyces salivalis* el cual tenía la capacidad de producir un antibiótico nuevo del tipo poliéster identificado como Martinomicina, activo contra bacterias Gram +.

Naruse y col. (1993) ( 28) En Bristol-Myers Squibb Research Institute, Tokio encontraron que una nueva cepa de *Microtetraspora parvosata* subsp.nov.producía nuevos antibióticos antivirales, designados como kistamicinas A y B, los cuales exhibían actividad contra el virus de la influenza tipo A y moderada actividad contra bacteria Gram positivas.

Katsuhisa K., Shigeru N. y col. (1993)(29) En New Drug Discovery Research Lab. Banyu Pharm Co. Japón aislaron una nueva sustancia antitumoral producida por un Streptomyceso BA18591. El principio activo fue extractado del micelio por metanol y purificado por cromatografía, este inhibió el crecimiento de células de cáncer estomacal humano en experimentos in vivo. Asimismo mostró actividad contra bacterias Gram-positivas y algunas bacterias Gram- negativas.

Shiosawa H, Takeshi K, y col. (1993) (30) En Biomedical Research Lab. Tokio aislaron un nuevo antibiótico denominado Thiomarinol, producido por una bacteria marina *Alteromonas rara* sp.nov. SANK 73390. Su estructura fue deducida como un compuesto híbrido de análogo del ácido pseudomonico y holotina. La actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas fue mayor que ambos ácidos y antibióticos pirrotrinos.

Katsuhisa Kojiri y cols. (1992) (31) En Exploratory Research Central Pharm. Japón aislaron un *Streptomyces* denominado A14106 y encontraron que producía un nuevo antibiótico macrocíclico lactámico BE-14106, el cual exhibía actividad citotóxica contra líneas celulares de tumor murino y actividad antimicrobiana.

Okamura, y cols. (1979) (32) En el Central Research Lab.Japan en un

estudio de selección de microorganismos con capacidad de producción de nuevos antibióticos B-lactámicos, encontraron, nueve cepas de *Streptomyces* que producían antibióticos B-lactámicos, una de ellas fue identificada como *Streptomyces fulvoviridis*.



## II. MATERIALES Y METODOS

### 1.1. Material biológico:

Muestras de suelo procedentes del Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica -UNMSM; del suelo de jardines Lima y suelo de terrenos agrícolas al interior de Lima(Supe y Huaral).

Cepas de Actinomycetos aislados de suelo.

Cepas de microorganismos de prueba:

*Escherichia coli*                      ATCC 25922

*Staphylococcus aureus*      ATCC 6538

*Bacillus subtilis*              ATCC 6633

*Micrococcus luteus*              ATCC 9341

### 1.2. Descripción de las Areas de Muestreo:

Se eligió como zonas de muestreo el suelo del Jardín Botánico de la Facultad de farmacia y Bioquímica -UNMSM, el suelo de jardines de parques de los distritos de Barranco y Surco, así como el suelo de terrenos agrícolas de Supe y Huaral-Lima.

En cada zona elegida, se considero dos puntos de muestreo que corresponden al horizonte A y horizonte B. Las distancias de los puntos de muestreo a los arboles variaron de 50 cm a 1 mt. , Respectivamente. Se realizo un total de 15 muestreos efectuados durante los meses de Octubre de 1994 a Abril de 1995, se analizaron un total de 30 muestras de suelo, que correspondieron a las profundidades de los horizontes A y B.

Para la elección de las zonas de muestreo en cada lugar escogido se

tuvo en consideración las características del suelo, tales como pH y humedad, se prefirió suelos secos neutros y alcalinos.

### **1.3. Colección de Muestras de Suelo**

Las muestras de suelo se colectaron de forma tan aséptica como fue posible, usando un sacabocados estéril, el cual se introdujo en cada punto correspondiente a la profundidad de cada horizonte A y B y se extrajo la muestra de suelo.

Se colectó aproximadamente 100 g y se depositó en bolsas nuevas de polipropileno de 5x10.

El material colectado se transporta en un conservador al laboratorio de Biotecnología del Instituto de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM para su procesamiento.

### **1.4. Pre-Tratamiento de las Muestras**

Con el propósito de favorecer el aislamiento no selectivo de *Actinomycetos* del suelo, todas las muestras colectadas se sometieron al tratamiento recomendado por Okamura y Koki (32), Demain y Nadine (33).

Este tratamiento consistió en pesar 25 g de muestra de suelo, luego verterla en una placa petri estéril, seguidamente humedecer la muestra con 10 ml de agua destilada estéril y dejarla secar al medio ambiente por 3 a 10 días. Este ciclo de humedecimiento y secado es repetido por 3 semanas, para ayudar a la reducción de la población bacteriana acompañante de la población de *Actinomycetos*. Transcurridas las 3 semanas la muestra de suelo secada es pulverizada en un mortero estéril para luego ser usada en el aislamiento.

## **1.5. Aislamiento de *Actinomycetos***

### ***Aislamiento Primario***

Para el aislamiento primario de *Actinomycetos* se tomo 10 g de cada una de las muestras sometidas a pre-tratamiento y se suspendió en 90 ml de solución salina fisiológica estéril conteniendo 0.02% de tween 80, agitando vigorosamente por 1 minuto en un vortex mixer, seguidamente se dejó reposar por 20 minutos para que las partículas y floculos sedimenten y de la capa superior de la suspensión se hicieron diluciones seriadas hasta  $10^3$  cel/ml. Posteriormente una alícuota de 0.1 ml de cada dilución se siembra con una espátula de vidrio sobre la superficie del Agar Arginina-glicerol-sales (AGS) para el aislamiento (32).

A este medio de aislamiento se le añadió antibióticos penicilina G (50 mg/l) y Nistatina (50 mg/l) para así inhibir la flora bacteriana y fungica acompañante.

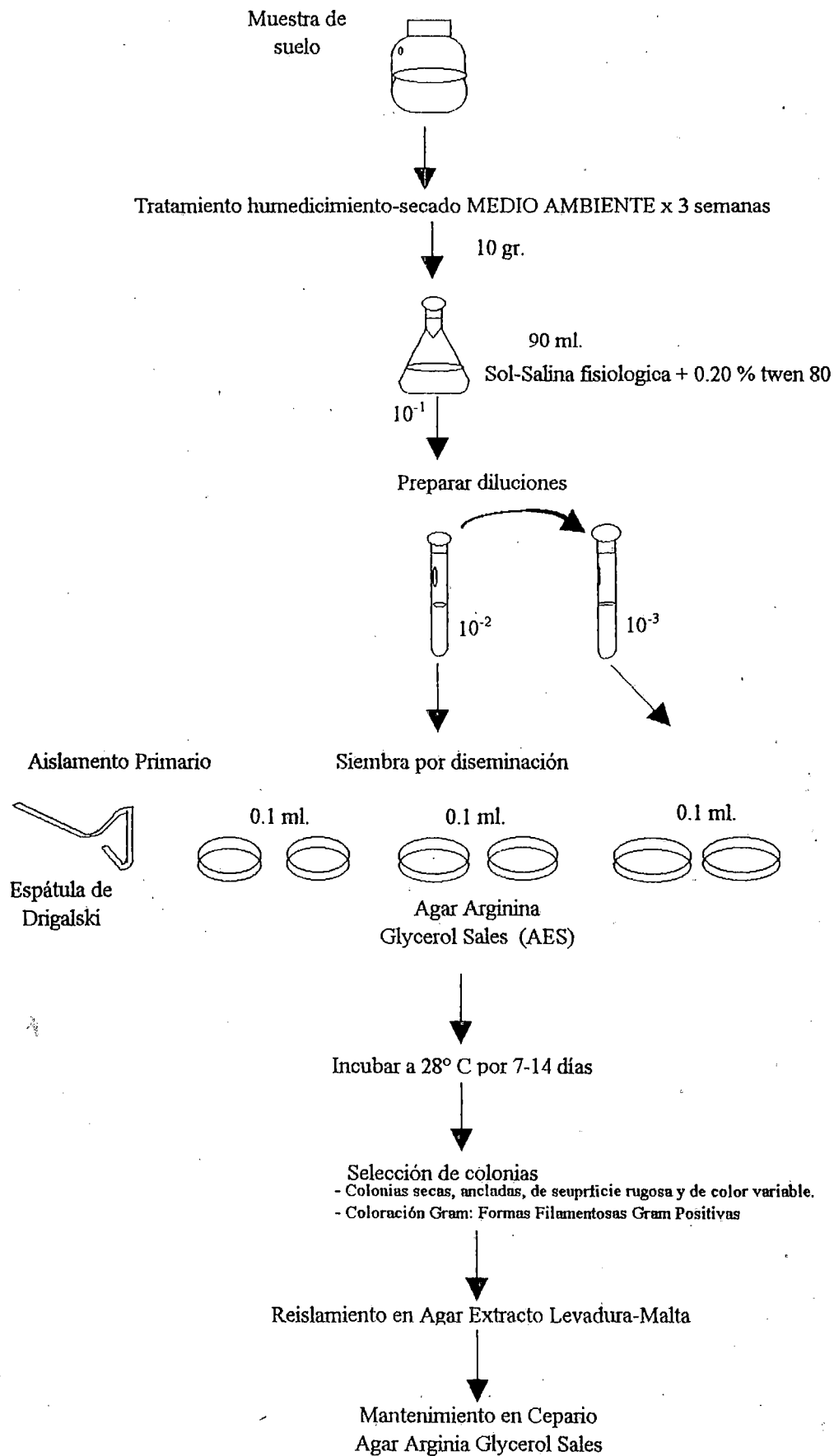
La incubación de las placas se realizó a 28°C por 7 a 14 días. Transcurrido el periodo de incubación se seleccionan aquellas colonias típicas de *Actinomycetos* caracterizadas por su aspecto de colonias secas, fuertemente adheridas al medio, tendiendo a anclar con el tiempo, de superficie aterciopelada, rugosa o pulverulenta y un micelio aéreo que varía de color.

La coloración Gram mostró la presencia de formas filamentosas ramificadas Gram positivas.

### ***Cultivo Secundario***

Las colonias seleccionadas en el aislamiento primario, fueron

**FIGURA N° 1**  
**DIAGRAMA PARA EL AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS DE**  
**MUESTRAS DE SUELO**



purificadas mediante un cultivo secundario en el Agar Extracto de levadura-extracto de malta (34), por una semana para luego ser transferidas nuevamente al medio AGS de aislamiento para su mantenimiento y preservación. ( Figura N° 1).

## **1.6. Selección de cepas de *Actinomycetos* con Actividad Antimicrobiana**

### ***Ensayo Cualitativo preliminar***

El ensayo cualitativo preliminar de la actividad antimicrobiana de las 100 cepas aisladas se hizo según el método de "Diseminación Cruzada"(Greim y Meyers, 1958), que consistió en sembrar por estrías cada una de las cepas de *Actinomycetos* sobre Agar Extracto de Malta-Extracto de Levadura (34) hasta un tercio de la placa e incubar a 28°C por 72 a 96 Hrs. , Para luego hacer la prueba de antagonismo frente a los microorganismos testigo.

Una vez que se observó buen crecimiento y esporulación de los cultivos, se sembraron los microorganismos testigo, haciendo estrías perpendiculares al cultivo de *Actinomiceto* y se incubaron las placas a 37°C por 24 a 48 hrs. La cepa de *Actinomiceto* que muestra actividad antimicrobiana exhibió zonas de inhibición de crecimiento en las áreas próximas al crecimiento del microorganismo testigo.

Los microorganismos de Prueba comprendieron bacterias Gram positivas tales como: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* ATCC 25922 y Hongos levaduriformes como *Cándida albicans*

ATCC 10231 y hongos filamentosos como *Aspergillus niger* ATCC

### ***Ensayo Confirmativo***

El ensayo de confirmación de la actividad antimicrobiana se hizo mediante el Test de Difusión sobre Agar (35) siguiendo la técnica de Excavacion-Placa-Cultivo que es una modificación de la técnica Cilindro-Placa-Cultivo recomendado por la Farmacopea Americana USP XXII, para la valoración de la potencia de antibióticos.

En este ensayo, las cepas de Actinomycetos con actividad antimicrobiana se sembraron en caldos de fermentación para obtener un cultivo líquido con el metabolito activo que fue enfrentado a los microorganismos de prueba.

### ***Cultivos para la Obtención de Metabolitos Activos***

Para este fin se probaron 04 medios de cultivo líquido para fermentación denominados como A, B, E y F recomendados por Okamura y Koki y Cols (32). Los mismos que se diferenciaron en su composición de sales, fuentes de carbono y nitrógeno, los que se distribuyeron en matraces de 250 ml con volúmenes de 50 ml cada uno.

(Anexos)

Luego se inocularon posteriormente con 25 ml provenientes del medio de obtención de inóculo denominado A-1. La siembra del medio A-1 distribuido en matraces de 125 ml a razón de 50 ml, se realizó inoculando 1 ml de una suspensión de esporas de cada uno de los cultivos de *Actinomycetos*, preparada en 10 ml de solución

salina fisiológica conteniendo 0.02% de tween 80 a partir de los cultivos de aislamiento en el medio AGS.

El medio A-1 inoculado se incubo por 48 Hrs, luego se tomo 10 ml para inocular cada uno de los medios de Fermentación A.B.E y F, se incubo en agitación (shaker) a 110 vibraciones por minuto a 28°C por 4-5 días.

Transcurridos los días de incubación se retiraron los cultivos líquidos y se transfirieron a tubos, para la separación de la masa celular por centrifugación a 6000 RPM por 15 minutos.

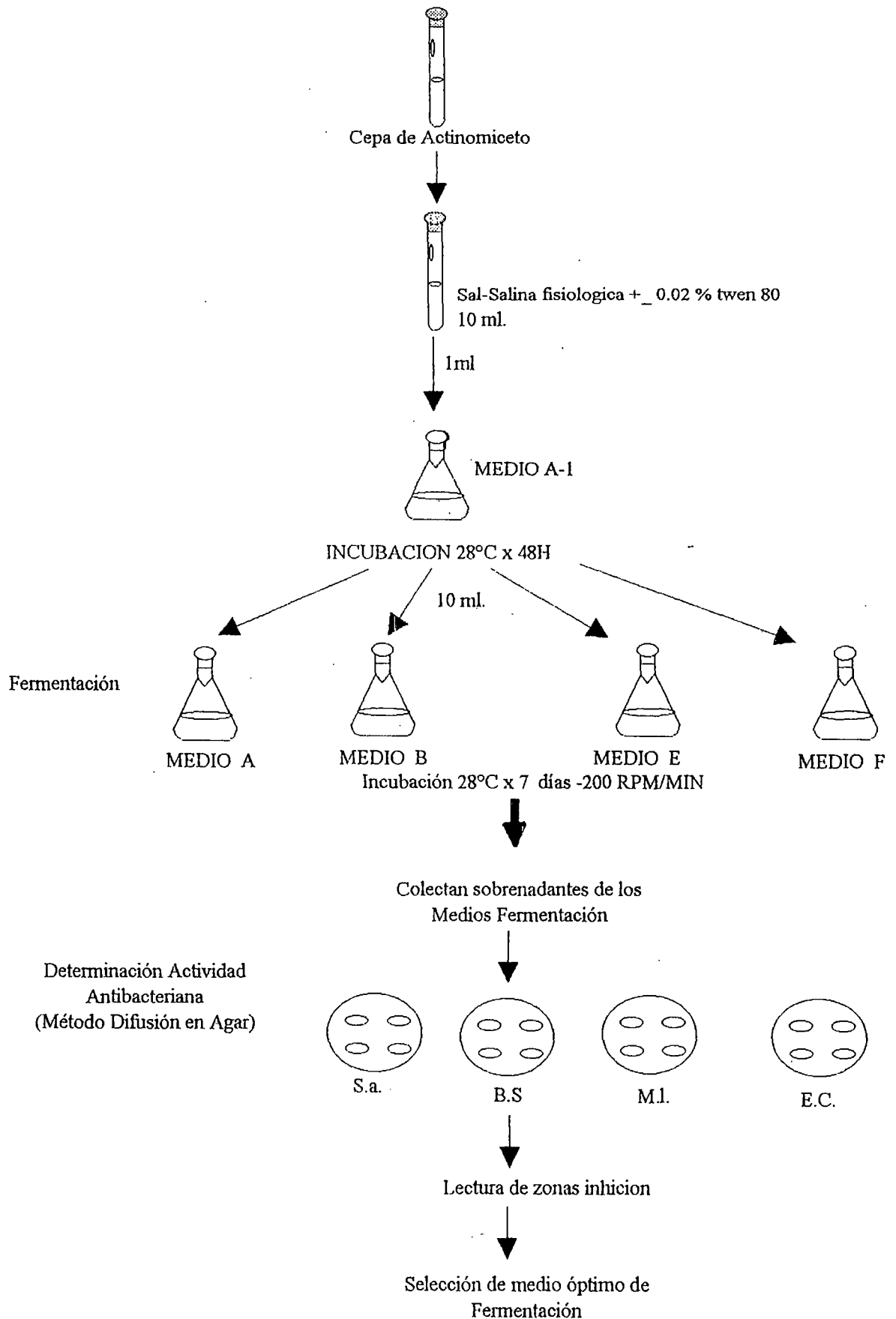
Los sobrenadantes conteniendo los metabolitos activos se colectaron cuidadosamente para desarrollar la prueba de difusión en agar y se refrigeraron hasta el momento de su uso a 4°C. (Figura N 2).

### ***Preparación de los microorganismos de Prueba***

Los microorganismos de prueba(bacteria RAM positivas y Gram negativas) fueron repicados en unos tubos con agar inclinado de TSA e incubados a 37°C por 24 horas. Luego a partir de estos cultivos se obtuvo una suspensión con 2-3 ml de Suero fisiológico estéril, y se vertió íntegramente en un frasco de Roux conteniendo TSA, se extendió en la superficie y se incubo invertida por 20 a 24 Hrs. A 37°C. Para las levaduras y hongos se siembro en Agar Sabouraud siguiendo el mismo procedimiento.

La cosecha del cultivo en los frascos Roux se hizo con 2-3 ml

**FIGURA N° 2**  
**DIAGRAMA PARA LA OBTENCION DE METABOLITOS ACTIVOS**  
**POR LOS ACTINOMICETOS MEDIANTE FERMENTACION**





de solución Fisiológica estéril y espátula de vidrio, se colectó la suspensión en un tubo de 13 x 100 mm y luego se hizo la dilución hasta obtener la turbidez del Tubo N°3 de la escala de Mac Farland que equivale a una concentración de  $9 \times 10^8$  m.o/ ml.

### ***Preparación de las placas de ensayo***

A cada 100 ml del medio TSA (Agar-peptona-caseína) fundido y mantenido a 45° en baño de agua, se agregó 1 ml de la suspensión del microorganismo de prueba ( $9 \times 10^8$  /ml) Se agitó suavemente el matraz con el propósito de homogeneizar la suspensión. Luego se dispuso series de placas petri estériles de 15 x 100 mm y se vertió en cada una en forma estéril 25 ml del agar TSA previamente inoculado con los respectivos microorganismos de prueba y se dejó solidificar. (35)

Seguidamente se señaló 04 puntos equidistantes y procedió a hacer pocillos, mediante los sacabocados de bronce de 9 mm de diámetro externo estériles, identificando a cada uno con el número correspondiente al metabolito de ensayo.

En lo que respecta a levaduras y hongos se utilizan el Agar Sabouraud como medio de prueba, y se siguió el mismo procedimiento que para bacterias.

### ***Determinación de la Actividad Antimicrobiana propiamente dicha***

Para la determinación de la Actividad Antimicrobiana propiamente dicha, de los sobrenadantes de los medios de fermentación A, B, E y F conteniendo los metabolitos activos producidos por cada una

de las cepas de *Actinomycetos* seleccionadas en el ensayo preliminar, se procedió a colocar 100 ul en cada pocillo, considerando una placa libre para utilizarla como control.

Posteriormente, las placas se dejaron en la refrigeradora por 20 a 30 minutos a 4 °C, con el objeto de permitir la difusión del metabolito activo, antes del crecimiento regular del microorganismo de prueba. Seguidamente se incubaron las placas sin invertir a 37°C por 24 horas para la actividad antibacteriana y por 48 horas para actividad antifúngica.

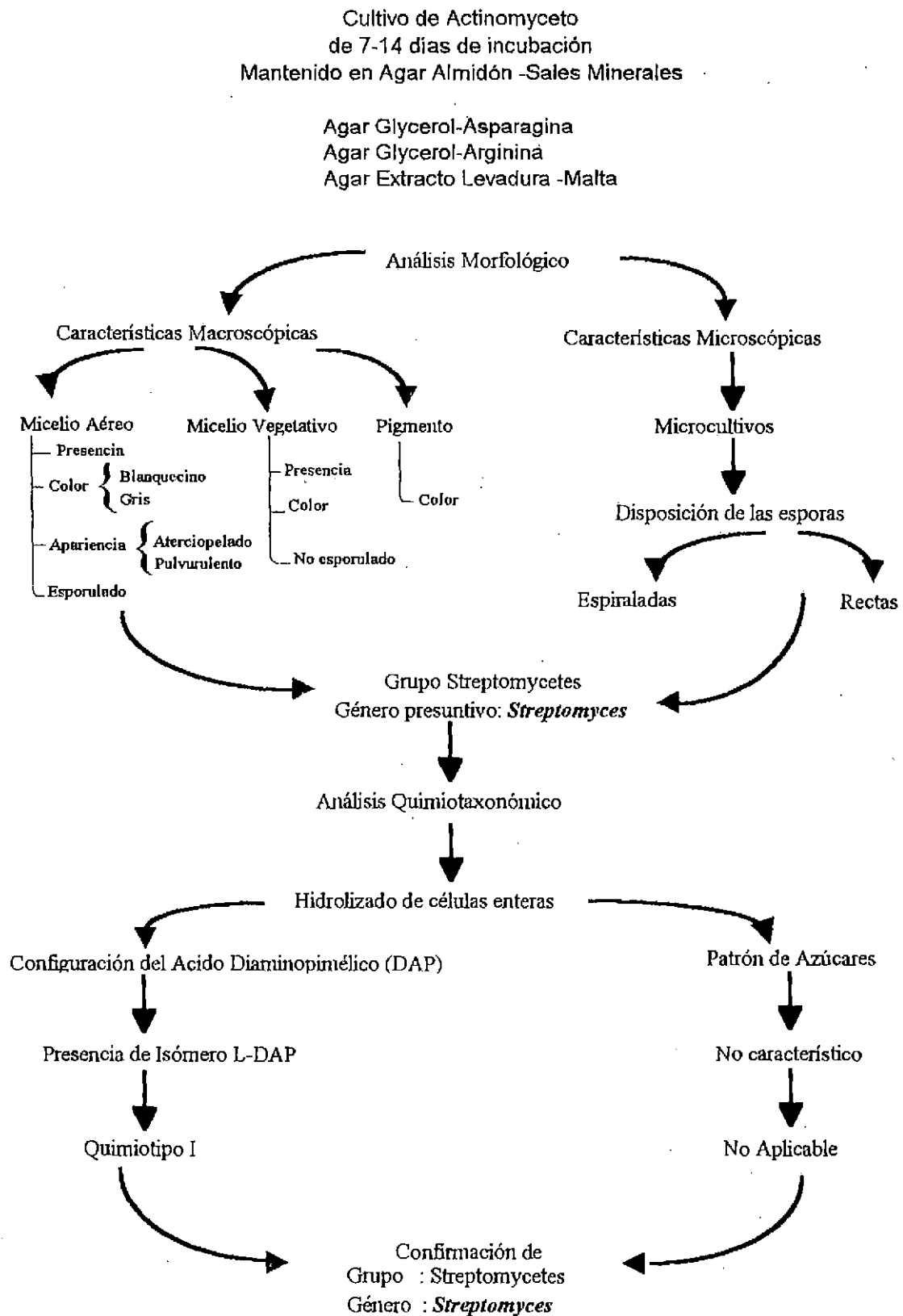
Transcurrido el tiempo de incubación, se midió cuidadosamente los diámetros de las zonas de inhibición alrededor de los pocillos.

## **1.7. CARACTERIZACION TAXONOMICA DE LAS CEPAS**

Para la identificación genérica de las cepas con mayor actividad antimicrobiana se siguieron las recordaciones establecidas por Williams y Col. (13) y los criterios establecidos por Lechevalier y Locci en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, Vol. 4, (36).

Los criterios utilizados se basaron en la observación morfológica microscópica y microscópica de las colonias aisladas de *Actinomycetos* que presentaron actividad antimicrobiana y en el análisis quimio-taxonomico para llegar al nivel de determinar el genero de los *Actinomycetos* seleccionados. ( Figura N° 3).

**FIGURA Nº 3**  
**DIAGRAMA PARA LA IDENTIFICACION DE ACTINOMICETOS**  
**DEL GRUPO STREPTOMYCETES**



### **1.7.1.ANALISIS MORFOLOGICO**

#### ***Estudio Macroscopico***

El estudio macroscopico consistió en la observación de las características morfológicas de las colonias de 7 a 14 días de antigüedad. Se considero la forma de la colonia, su aspecto, consistencia en el medio, evaluación del tipo de micelio aéreo y micelio vegetativo y el color que presentan cada uno de ellos y la producción de pigmentos del micelio substrato.

Para estas observaciones las cepas motivo de estudio se sembraron en 4 medios: Agar Almidón- Sales inorgánicas; Agar Glicerol-Asparagina; Agar extracto de levadura y malta y el Agar glicerol-Arginina, incubar por 7 a 14 días a 28°C.

#### ***Estudio Microscópico***

Las observaciones microscópicas se hicieron para evaluar el tipo y disposición de las esporas, que permite diferenciar los géneros de los *Actinomycetos*.

Para esto se realizaron microcultivos con laminillas inclinadas en Agar Arginina-Glicerol Sales (AGS) y las cepas se sembraron en él área más próxima a la laminilla, se incubaron los cultivos a 28°C por 2-7 días. Una vez que se observo un cultivo bien esporulado se retiro la laminilla y se coloco directamente en una lamina portaobjeto para observar al microscopio.

### 1.7.2. ANALISIS QUIMIO-TAXONOMICO

La determinación del genero de las cepas de *Actinomycetos* seleccionadas por presentar una mayor actividad antimicrobiana se realizo mediante la metodología propuesta por Lechevalier (37), Staneck y Roberts (15) y por Schaal(38). Los ensayos consistieron en el análisis de la configuración de isómeros (L, M) del Acido diaminopimelico (DAP) presente en la pared celular de los Actinomycetos y el análisis del patrón de azucares de células enteras mediante técnicas cromatograficas.

#### ***Obtención de Biomasa***

En el caldo de fermentación F distribuido en matraces a razón de 50 ml por matraz, se sembraron las cepas de *Actinomycetos* seleccionados para el ensayo quimio-taxonomico. Para la siembra se hizo una suspensión de esporas similar a la realizada para la obtención de metabolitos activos. Luego los matraces inoculados se incubaron a 28 °C con agitación a 110 vibraciones por minuto por 5-6 días. Transcurrido este tiempo las cepas se retiraron del agitador y se procedió a inactivar las células mediante calentamiento en Baño María a 75°C por 45 minutos. Luego se centrifugo el cultivo a 6000 RPM X 20 minutos, se elimino el sobrenadante y el paquete celular se lavo dos veces con agua destilada estéril y una vez con etanol absoluto. Obtenida la Biomasa se deshidrato por desecación a 40 °C por 24 Hrs.y se conservo en un desecador hasta su utilización en los ensayos quimio-taxonomicos.

### ***Detección de 2,6 - Acido Diaminopimelico en Hidrolizados de Células Enteras.***

Se tomo 3-5 mg de peso seco de Biomasa y se colocó en frascos viales con tapa rosca, se añadió 1 ml de HCl 6N, y se llevo a calentamiento en horno a 100°C por 18 Hrs. Para hidrolizar las células enteras Una vez enfriado el hidrolizado, se filtro a través de papel Whatman N°1 y el filtrado obtenido se evapora en Baño María a 100°C. El residuo se disolvió en 1 ml de agua destilada estéril y se evaporo nuevamente. El residuo final se redisolvió en 0.4 ml de agua destilada.

#### **Cromatografía en Capa Fina**

El residuo final del hidrolizado de células de cada una de las cepas motivo de estudio, se sembró mediante microcapilares sobre la base de placas de vidrio (20 X 5) cubiertas con silicagel GF 254 para cromatografía en capa fina, haciendo 50-60 aplicaciones.

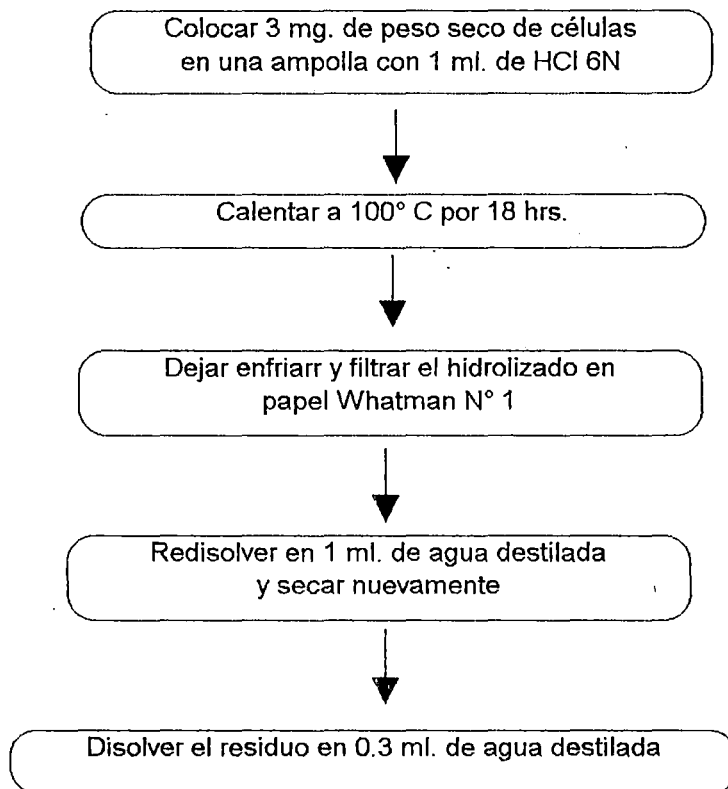
La separación de los aminoácidos se realizó por una cromatografía dimensional única ascendente en capa fina, en un sistema de solventes que contiene: Metanol-piridina-HCl 6N-agua destilada (80:10: 25: 17.5,V/V)

Para una mejor separación e identificación de los isómeros del ácido DAP, se hizo una segunda corrida en la misma dirección y con la misma mezcla de solventes.

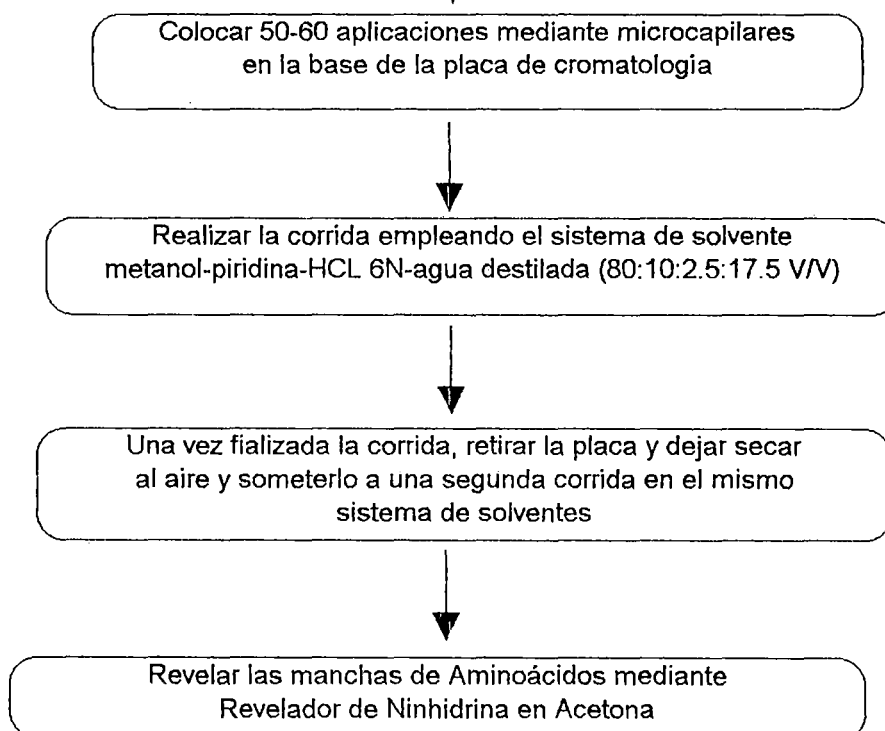
En cada ensayo se colocó una solución estándar de

**FIGURA N° 4**  
**DETERMINACION DEL ACIDO DIAMINOPIMELICO**  
**EN EXTRACTOS CELULARES**

**HIDROLISIS**



**CROMATOGRAFIA**



Acido Diaminopimelico (DAP)(Sigma) 0.01M, que contiene la mezcla de isómeros L y M

### **Revelado e Identificación de los Isómeros Del Acido Diaminopimelico**

El revelado de los cromatogramas se realizo con el reactivo revelador Nynhidrina en Acetona al 0.1 % W/V (Esquema N°4). Luego se seco al aire y calentó las placas a 100 °C por 2-5 minutos. Los isómeros del Acido DAP producen manchas verde oliva que llega a amarillas y migran lentamente. Siendo el isómero L el que migra por delante del isómero M. Los otros aminoácidos presentes en los hidrolizados de células desarrollan manchas de color púrpura.

### ***Detección de Azucres en Hidrolizados de células enteras***

Se peso aproximadamente 50 mg de peso seco de biomasa y se coloco en frascos viales de tapa rosca. Se añadió 1.5 ml de ácido sulfúrico 2N y se calentó a 100 °C en agua hirviendo por 2 Hrs.

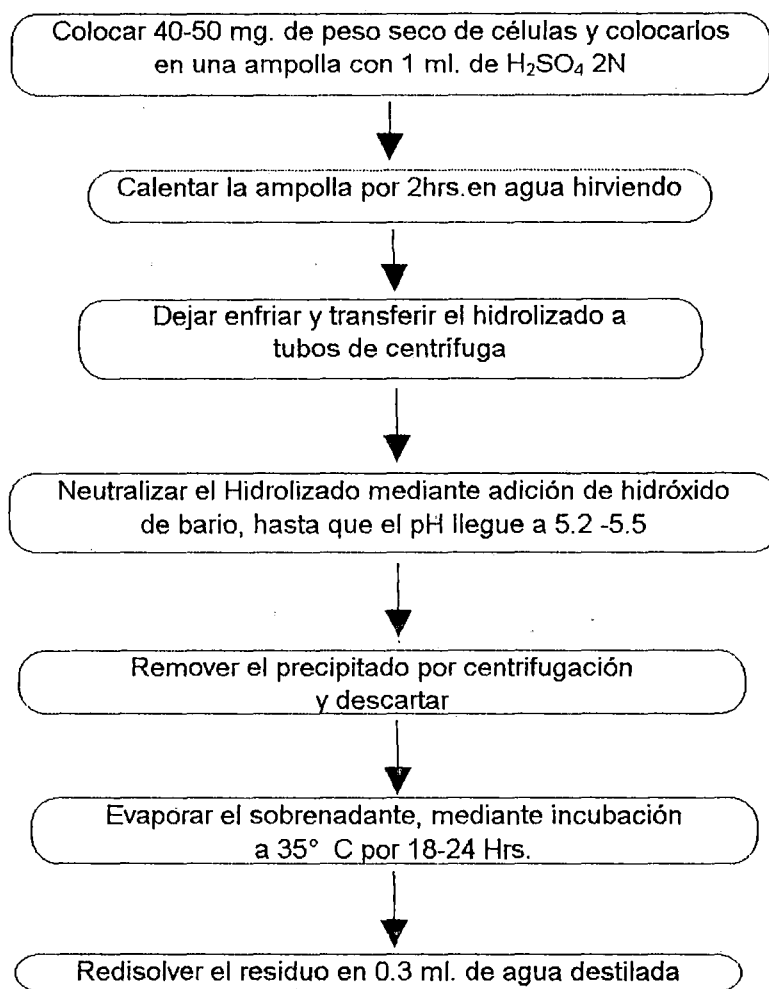
Remanentes de Ba(OH)<sub>2</sub> son sedimentados por centrifugación a 6000 RPM. El sobrenadante se removió cuidadosamente y evaporo hasta el secado mediante incubación a 37°C por 24-48 Hrs. El residuo seco es redissuelto en 0,4 ml de agua destilada y luego se añadió aproximadamente 1 ml de piridina.

Se agito la mezcla y se centrifugo a 6000 RPM para separar la fase pridínica de la acuosa. La capa de piridina superior es la que

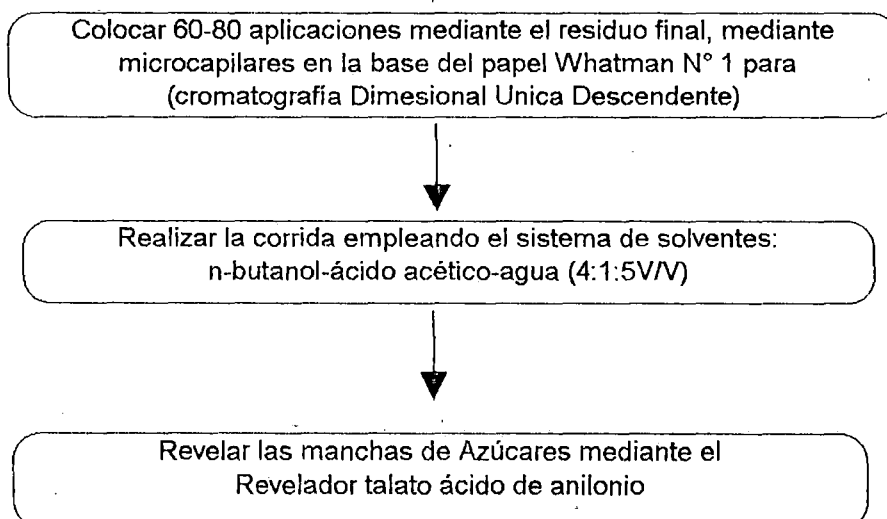


**FIGURA N° 5**  
**DETERMINACION DE AZUCARES**  
**EXTRACTOS CELULARES**

**HIDROLISIS**



**CROMATOGRAFIA**



contiene el extracto de azúcar purificado. Esta extracción se hizo por dos veces para obtener al final un extracto concentrado en piridina.

### **Cromatografía en capa fina**

La separación de los azúcares se realizó por una cromatografía dimensional única ascendente en capa fina sobre placas de silicagel G F254, en las que se sembró los extractos piridinicos de cada una de las cepas evaluadas, haciendo 60-80 aplicaciones por muestra. El sistema de solventes contiene:

n-butanol- ácido acético-agua destilada (4: 1: 5 V/V).

En cada corrida se colocó los estándares de azúcares al 0.15% tales como: glucosa, galactosa, ribosa, xilosa, manosa, rhamnosa.

### **Revelado e Identificación de los Azúcares**

Para el revelado de los cromatogramas se utilizó el reactivo revelador Talato ácido de anilinio, seguido por un secado al aire y calentamiento en estufa a 100°C por 3-5 minutos.

Las hexosas desarrollaron manchas marrones, las pentosas manchas rojas.

El orden de migración de los azúcares se incrementó en la siguiente serie: Galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa, fucosa, ribosa y rhamnosa (Figura N°5).

### **1.7.3. DESCOMPOSICION DE FUENTES DE NITROGENO**

Uno de los criterios fisiológicos útiles para la identificación de especies de *Actinomycetos* aeróbicos es su capacidad para metabolizar ciertos aminoácidos y proteínas (39).

Las cepas de *actinomycetos* seleccionadas se sembraron en placas de Agar AGS a las que se les adiciono 3 diferentes fuentes de nitrógeno, como caseína, xantina y tirosina a una concentración de 10% W/V.

Se incubo a 28°C por 48 a 72 horas y se realizo la lectura.

### **1.7.4. PRODUCCION DE CATALASA**

La prueba de producción de catalasa, enzima que es capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno con formación de agua y oxígeno molecular, se utilizo para limitar los géneros de las cepas de *Actinomycetos* en estudio.

El procedimiento, consistió en realizar una suspensión de la cepa, colocarla sobre una lamina portaobjetos y luego adicionarle 1 gotita de peróxido de hidrogeno al 3%.

El desprendimiento de burbujas es indicio de la producción de catalasa.

## **1.8. ENSAYOS QUIMICOS PRELIMINARES DE DETERMINACION DEL METABOLITO ACTIVO**

Los metabolitos activos de 4 cepas de *Actinomycetos* que evidenciaron una gran actividad antimicrobiana, se sometieron a un ensayo

químico preliminar en el afán de elucidar posteriormente la estructura química.

Para esta determinación se procedió a sembrar las 4 cepas en el medio de fermentación F, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se trabajo un volumen de 250 ml de caldo de fermentación y el tiempo de incubación se incremento a 14 días a 28°C (3)

Para la extracción del metabolito activo, se centrifugo los caldos de fermentación para separar las células a 3000 RPM por 20 minutos, luego el sobrenadante se filtro al vacío en membranas Millipore de 0.45  $\mu$ m, seguidamente se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 0.1 N y se procedió a la extracción con acetato de etilo por 2 veces (26,27). El extracto fue lavado con sulfato de sodio anhidro y evaporado hasta obtener un residuo para los ensayos químicos.

## **CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA**

Los extractos de metabolito activo, son redisolviéron en 500  $\mu$ l de acetato de etilo, luego se sembraron en placas de Silicagel G F254 de 10 x 20 mm, haciendo 50 aplicaciones con un microcapilar. La separación de los metabolitos activos se realizo en cromatografia ascendente, para lo cual se probaron 6 diferentes sistemas de solventes, los cuales fueron usados por Randerath, K. (40) para determinar el comportamiento de diferentes antibióticos. Estos sistemas de solventes fueron:

\* n-Hexano /Acetona (3:2)

\* Cloroformo/Metano/Hidróxido de amonio (80: 20: 1)

\* Cloroformo/Metano (10:1)

\* Benceno/Acetona (1: 1)

\* Cloroformo/Acetona(4: 1)

\* Acetato de Etilo/Metanol/Agua(10:3:1)

Los reveladores empleados son:

\* Acido sulfúrico 0.2M revelador Universal

\* Permanganato de potasio al 0.05%, revelador para compuestos fácilmente oxidables (41)

\* Reactivo de Hidroxilamina-  $\text{Cl}_3\text{Fe III}$ , revelador para lactonas, esteres, amidas, y anhídridos ácidos carboxílicos (42)

\* Acido pícrico, reactivo revelador para epoxidos (43).

Estos reveladores se utilizaron para elucidar los grupos funcionales del metabolito activo, luego de haber seleccionado el sistema de solventes optimo.

## ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Los residuos secos de dos metabolitos activos (CA-25 y CA-93), fueron analizados por espectroscopia infrarroja en un equipo IR Nicolet(con una lectura de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) de la facultad de Química de la UNMSM.

Para el desarrollo de la prueba los residuos se incorporaron a pastillas de BrK para su lectura, en una proporción de 10:1 con la muestra problema. La lectura se hizo en una macro celda siguiendo la técnica denominada "Drift", que el método utilizado para muestras sólidas.

### III. RESULTADOS

TABLA N° 01

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE 100 CEPAS DE ACTINOMICETOS DE SUELO FRENTE A CEPAS ESTANDARES POR EL METODO CUALITATIVO DE DISEMINACION CRUZADA

CEPAS	ESCHERICHIA COLI ATCC25922	STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC6538	MICROCOCCUS LUTEUS ATCC9341	BACILLUS SUBTILIS ATCC6833	CANDIDA ALBICANS ATCC10231	ASPERGILLUS NIGER ATCC16404
CA-03	+	+	+	-	+	+
CA-04	-	+	+	+	-	-
CA-05	-	+	+	+	-	+
CA-07	-	-	-	-	+	-
CA-09	-	+	+	+	-	+
CA-10	-	+	+	-	+	-
CA-11	-	-	+	-	-	+
CA-12	-	-	-	-	-	+
CA-13	-	-	-	-	+	+
CA-17	+	-	-	-	+	+
CA-19	-	+	+	-	+	+
CA-20	-	-	+	-	-	-
CA-21	-	-	-	-	-	+
CA-22	-	+	-	-	+	+
CA-23	-	-	-	-	-	+
CA-25	-	+	+	+	-	+
CA-27	-	+	+	-	+	+
CA-28	-	-	+	-	-	-
CA-29	-	-	-	-	-	+
CA-30	-	-	+	-	-	-
CA-32	-	-	+	+	+	+
CA-33	-	-	-	-	-	+
CA-36	+	-	+	-	-	+
CA-37	-	-	+	-	-	-
CA-38	+	+	+	-	-	+
CA-42	-	+	+	+	-	+
CA-43	-	+	+	-	-	+
CA-44	-	-	+	-	-	-
CA-45	+	-	-	-	-	+
CA-46	-	-	-	-	-	+
CA-47	-	-	-	-	-	+
CA-49	-	-	-	-	-	+
CA-50	-	-	-	-	-	+
CA-53	-	-	+	-	-	-
CA-55	-	-	+	-	-	-
CA-59	-	+	+	-	-	+
CA-61	-	-	-	-	-	+
CA-62	-	-	-	-	+	-
CA-65	-	-	+	+	+	-
CA-69	-	-	+	+	-	+
CA-71	-	-	+	+	-	+
CA-73	-	+	+	-	-	+
CA-75	-	+	+	-	-	+
CA-77	-	-	-	-	-	+
CA-80	-	-	-	-	-	+
CA-82	-	-	-	-	-	+
CA-84	-	-	+	-	-	-
CA-89	-	-	-	-	-	+
CA-90	-	+	+	-	+	+
CA-91	-	+	+	-	+	+
CA-93	+	-	+	+	+	+
CA-94	-	-	-	-	+	+

TABLA Nº 2

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE 24 CEPAS DE ACTINOMYCETOS  
EN DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION DE ACUERDO A LA ZONA DE INHIBICION

CEPAS	Medio A				Medio B				Medio E				Medio F.			
	Sa	Me	Bs	E.c.	Sa	Me	Bs	E.c.	Sa	Me	Bs	E.c.	Sa	Me	Bs	E.c.
CA-03	1	1		1	-	-		1	1	1	-	1	2	2		2
CA-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-
CA-05	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	2	2	2	-
CA-09	1	1	-	-	1	1	1	-	2	2	2	-	3	3	3	-
CA-10	-	-	-	1	1	1	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-
CA-17	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	-
CA-19	-	-	1	1	-	-	1	-	1	1	-	-	2	2	-	-
CA-22	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	-
CA-25	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	-	3	2	2	-
CA-27	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2		
CA-32	-	-	1		-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2	-
CA-36	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	2	-	1
CA-38	-	-	-	1	-	-	-	2	1	1	-	1	2	2	-	3
CA-42	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	2	2	2	-
CA-43	1	-	-	-	1	-	-	-	2	1	-	-	3	2	-	-
CA-59	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-
CA-65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	2	-
CA-69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	2	2	-
CA-71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	2	3	-
CA-73	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-
CA-75	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	2	3	-	-
CA-90	-	-	-	1	1	1	-	2	1	1	-	1	2	3	-	2
CA-91	1	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	2	2	-	-
CA-93	-	-	-	1	1	-	-	-	0	1	1	2	0	2	2	3

Sa = Staphylococcus aureus ATCC 6538

Me = Micrococcus luteus ATCC9341

Bs = Bacillus Subtilis ATCC6633

Ec = Escherichia Coli ATCC 2592

DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION

1 >= 10 mm

2 >= 20 mm

3 >= 30mm

**TABLA N° 3**  
**FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE 24 CEPAS DE ACTINOMYCETOS**  
**UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION**

<b>Medios de</b>	<b>Staphylococcus</b>	<b>Micrococcus</b>	<b>Bacillus subtilis</b>	<b>Escherichia coli</b>
	<b>aureus</b>	<b>luteus</b>		
<b>Fermentación</b>	<b>ATCC6538</b>	<b>ATCC 9341</b>	<b>ATCC 6633</b>	<b>ATCC 25922</b>
<b>A</b>	4	2	2	7
	16,66%	8,33%	8,33%	29,16%
<b>B</b>	7	6	4	4
	29,16%	25,00%	16,66%	16,66%
<b>E</b>	17	21	10	6
	70,83%	87,50%	41,66%	25,00%
<b>F</b>	18	22	10	6
	75,00%	91,66%	41,66%	25,00%



## FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE 24 CEPAS DE ACTINOMYCETOS UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION

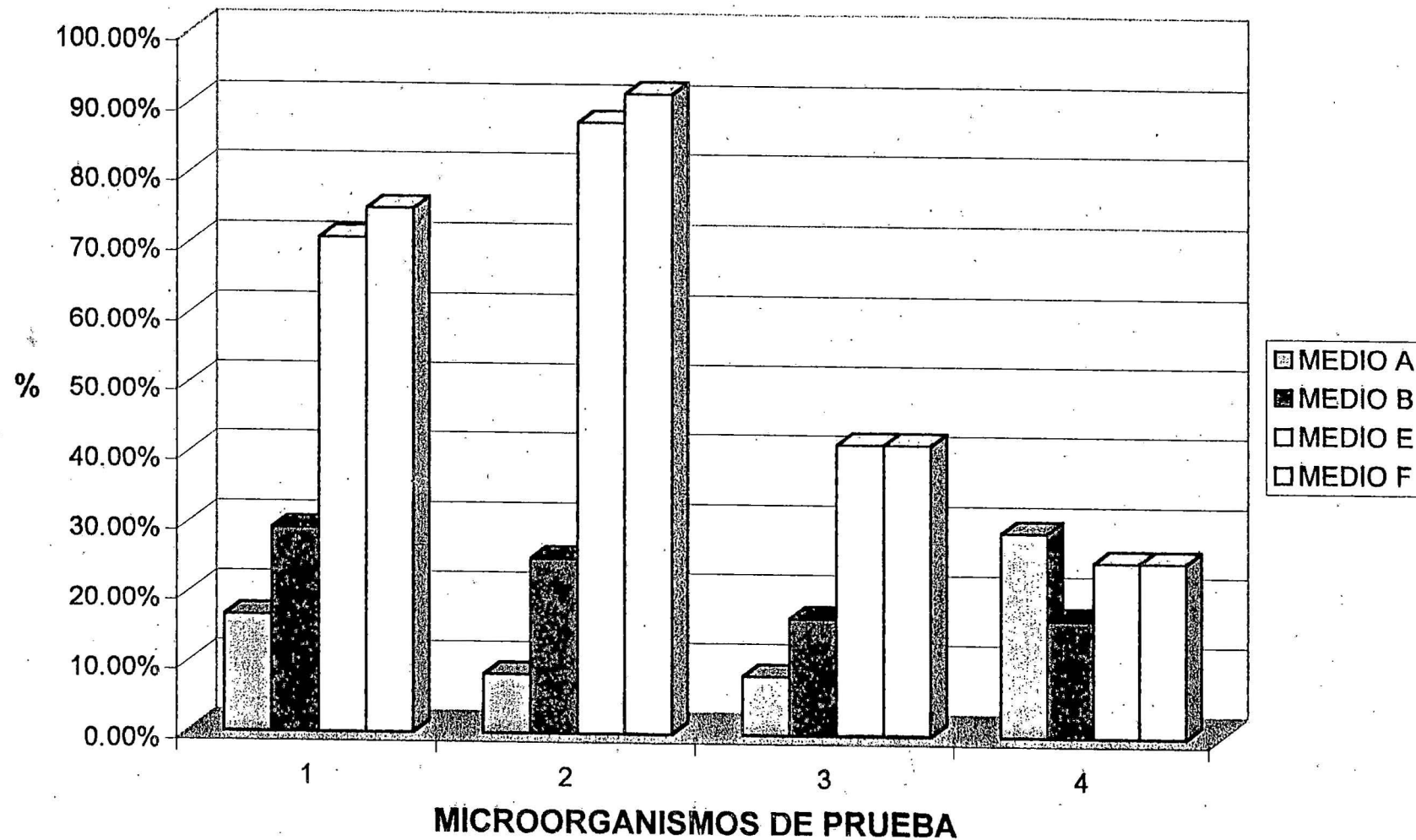


TABLA N° 04

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE 24 CEPAS DE ACTINOMICETOS  
DE SUELO FRENTE A CEPAS ESTANDARES POR EL METODO DE DIFUSION EN AGAR  
TECNICO EXCAVACION - PLACA - CULTIVO

CEPAS	STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC6538	MICROCOCCUS LUTEUS ATCC9341	BACILLUS SUBTILIS ATCC6633	ESCHERICHIA COLI ATCC 25922
CA-03	++++	++		+
CA-04	++	++	+	-
CA-05	+++	++	+	-
CA-09	++++	+++	++	-
CA-10	++	++	-	-
CA-17	-	-	-	++
CA-19	+++	++	-	-
CA-22	++	-	-	-
CA-25	++++	+++	++	
CA-27	++	++		
CA-32		+++	++	
CA-36		++		+
CA-38	+++	++		++
CA-42	+++	+++	++	
CA-43	+++	+++		
CA-59	+++	+++		
CA-65		+++	++	
CA-69		++	++	-
CA-71		++	+++	-
CA-73	++	++		
CA-75	++	+++		++
CA-90	+++	+++		
CA-91	++	++		
CA-93	+++	++	++	++

Diámetro de la zona de inhibición

+ [ >= 10 mm]  
 ++ [ 20-30 mm]  
 +++ [ 30-40 mm]  
 ++++ [ 40-50 mm]

Medio de fermentación utilizado F.

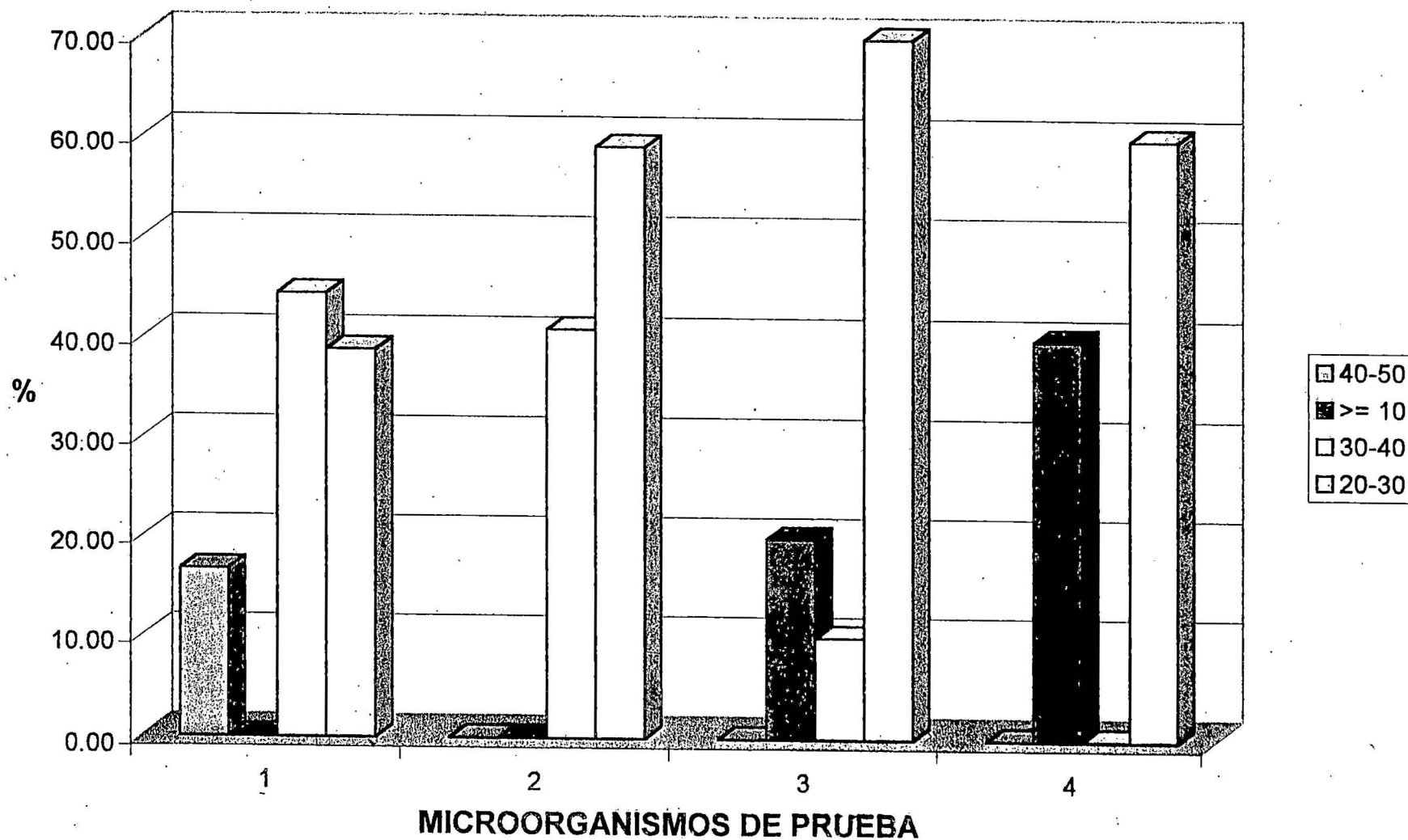
**TABLA N° 5**

**FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ACTINOMYCETOS  
DE SUELO SEGÚN LA ZONA DE INHIBICION**

**C E P A S**

DIAMETRO DE ZONAS DE INHIBICION (mm)	Staphylococcus aureus ATCC 6538		Micrococcus luteus ATCC 9341		Bacillus subtilis ATCC 6633		Escherichia coli ATCC25922	
	Número de cepas	porcentaje %	Número de cepas	porcentaje %	Número de cepas	porcentaje %	Número de cepas	porcentaje %
>= 10	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	20,00	2,00	40,00
20-30	7,00	38,80	13,00	59,09	7,00	70,00	4,00	60,00
30-40	8,00	44,40	9,00	40,90	1,00	10,00	0,00	0,00
40-50	3,00	16,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total de Cepas	18		22		10		6	

## FRECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ACTINOMYCETOS DE SUELO SEGUN LA ZONA DE INHIBICION



**TABLA N° 6**  
**COMPARACION DE LAS CARACTERISTICAS CULTURALES DE 12 CEPAS DE ACTINOMYCETOS FRENTE A DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO a,b.**

CEPAS	Agar Extracto de levadura - malta (ISP2)				Agar Glicerol asparagina (ISP5)				Agar Almidon sales minerales (ISP4)			
	C	MA	MS	PS	C	MA	MS	PS	C	MA	MS	PS
CA-03	Abundante	Rosado Cremoso	Blanco	Melanoide	Abundante	Rosado amarillento	Blanco	Melanoide	Abundante	Gris blanquecino	Rosado amarillento	Melanoide
CA-05	Abundante	Amarillo	Amarillo	Negativo	Abundante	Blanco	Amarillento	Melanoide	Abundante	Gris verdoso	Pardo	Negativo
CA-09	Abundante	Blanco	Amarillento	Negativo	Abundante	Gris	Blanco	Negativo	Abundante	Blanco grisaceo	Blanco	Negativo
CA-25	Abundante	Amarillo	Blanco amarillento	Negativo	Abundante	Gris verdoso	Verde	Negativo	Abundante	Verde olivo	Blanco	Negativo
CA-27	Abundante	Crema	Crema	Negativo	Abundante	Blanco amarillento	Blanco	Melanoide	Abundante	Gris	Marrón	Negativo
CA-42	Abundante	Gris	Blanco	Negativo	Abundante	Azulado	Gris	Azul	Abundante	Azulado	Blanco	Negativo
CA-43	Abundante	Verde blanquesino	Blanco	Negativo	Abundante	Blanco	Blanco	Negativo	Abundante	Palo rosa	Blanco	Negativo
CA-59	Abundante	Blanco grisaceo	Blanco	Negativo	Abundante	Pardo	Amarillento	Negativo	Abundante	Gris	Marrón	Negativo
CA-61	Abundante	Amarillo	Blanco amarillento	Negativo	Abundante	Gris oscuro	Marron	Negativo	Abundante	Gris oscuro	Pardo	Negativo
CA-89	Abundante	Blanco	Amarillo	Negativo	Abundante	Amarillo	Blanco	Negativo	Abundante	Gris	Blanco	Negativo
CA-90	Abundante	Blanco	Blanco	Negativo	Abundante	Blanco	Blanco	Negativo	Abundante	Amarillento	Blanco	Negativo
CA-93	Abundante	Amarillo	Amarillo	Negativo	Abundante	Blanco	Pardo amarillento	Negativo	Abundante	Amarillento	Gris	Negativo

C = Crecimiento  
MA = Micelio Aereo  
MS = Micelio substrato  
Ps = Pigmento soluble

a = observados después de incubación x 3 semanas a 28°  
b = descritos por el International Streptomyces Project (IS and Gordon et al., 1978

Valerie S. Bernan , Deborah A ( 1994) The Journal of Antibiotic Vol 47 N° 12

**TABLA Nº 7**

**IDENTIFICACION QUIMIOTAXONOMICA DE 12 CEPAS DE ACTINOMYCETOS  
AEROBICOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

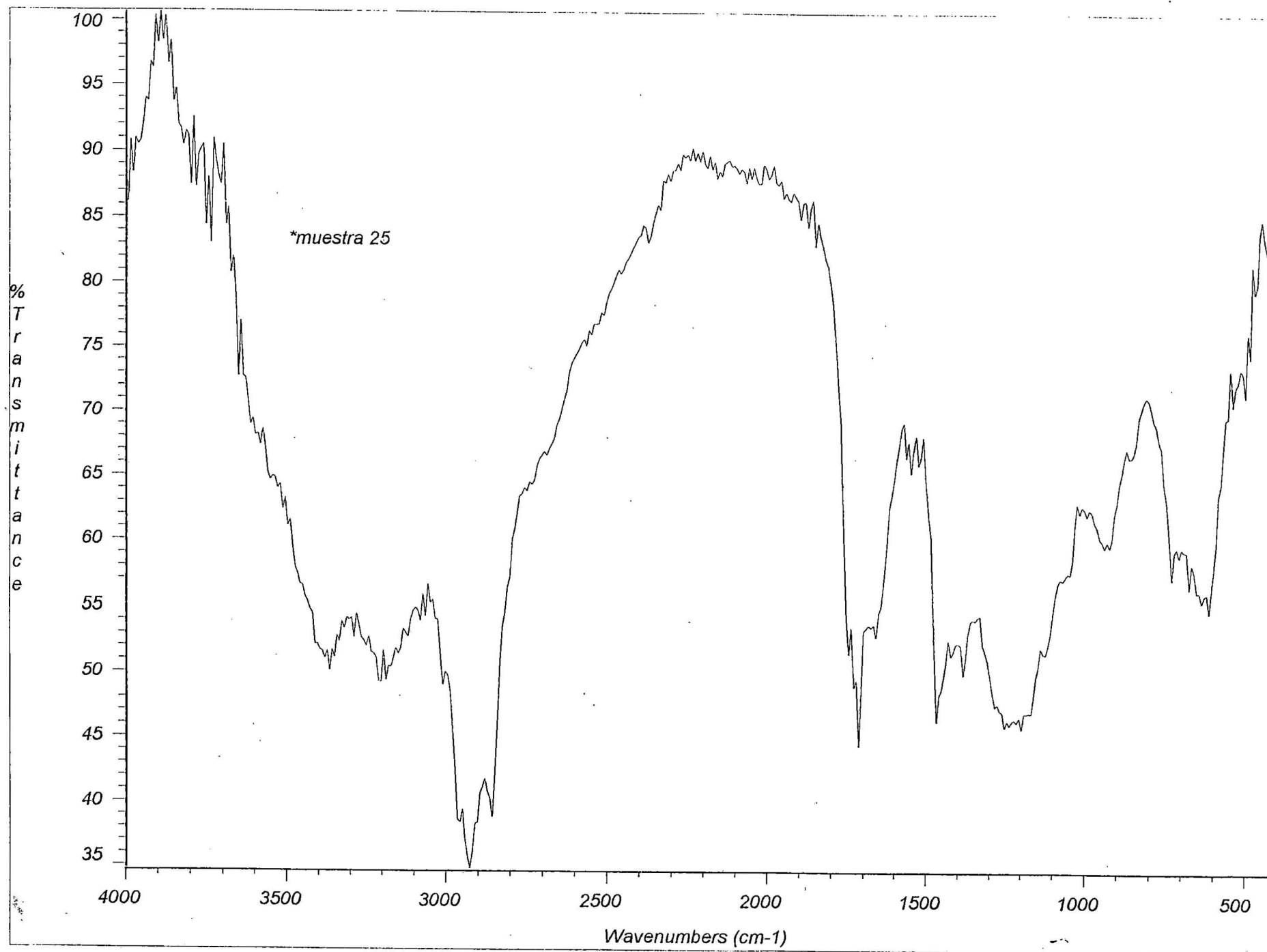
MICROORGANISMOS CEPAS	ANALISIS QUIMIOTAXONOMICO		DESCOMPOSICION DE FUENTES DE NITROGENO			CATALOSA
	ISOMEROS DAP	PATRON DE AZUCARES	CASEINA	TIROSINA	XANTINA	
A-03	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-05	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-09	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-25	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-27	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-42	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-43	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-59	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-61	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-89	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-90	L-DAP	NC	+	+	+	+
A-93	L-DAP	NC	+	+	+	+

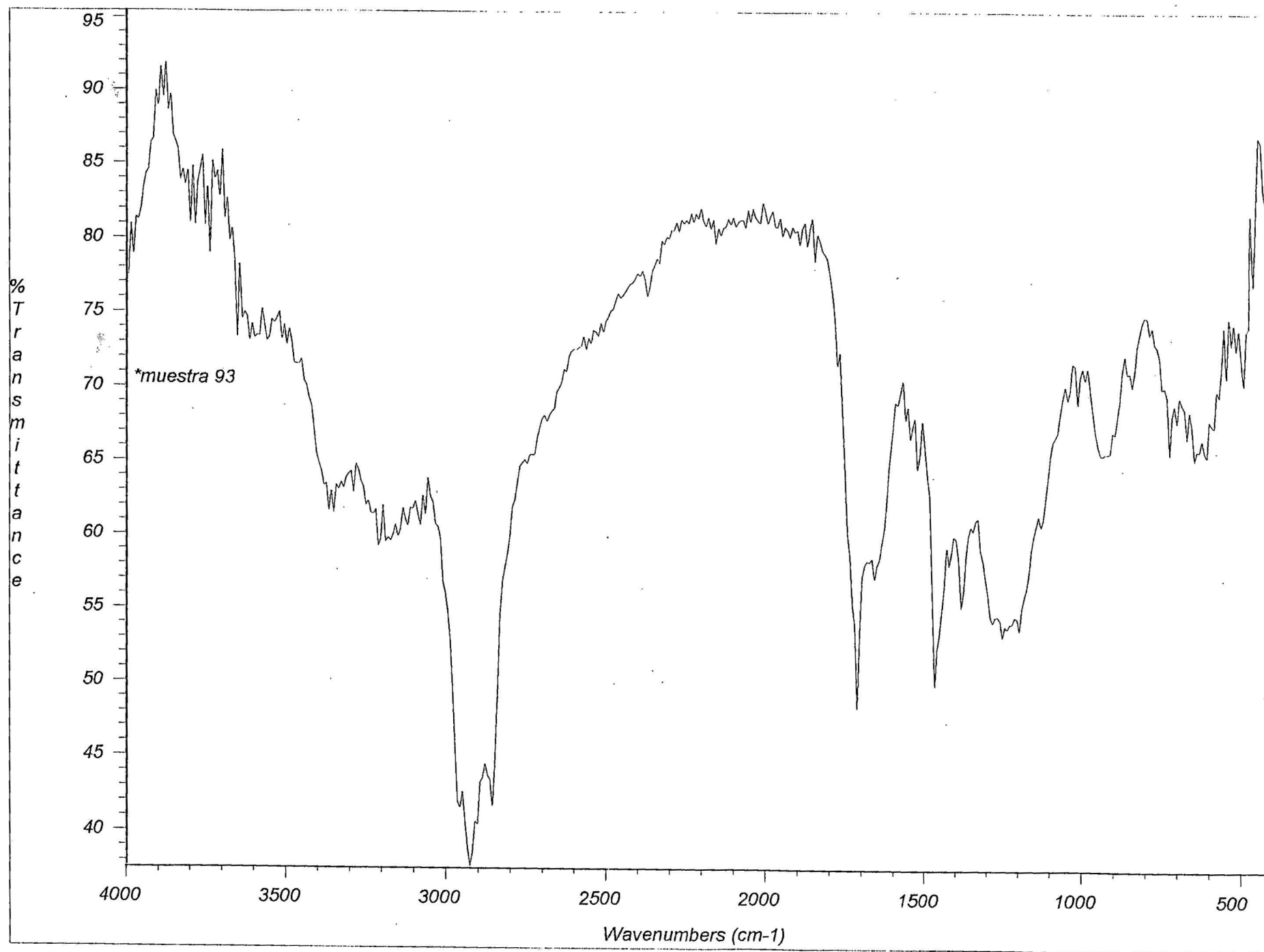
NC

= patrón de AZUCARES no característico

L-DAP

= L - Diaminopimelico ácido







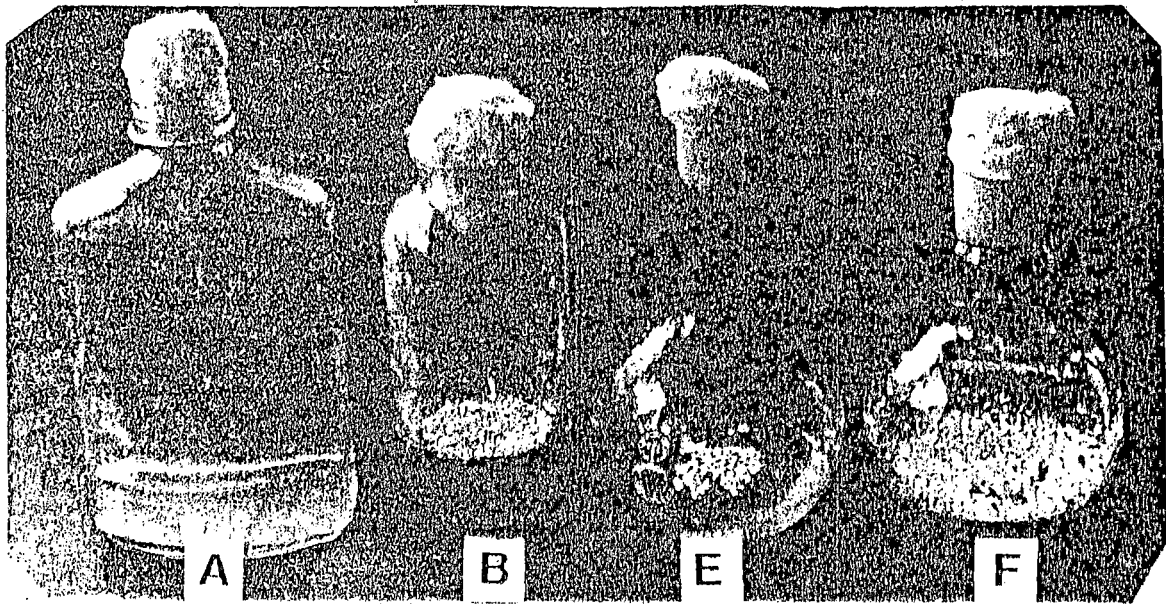


Foto N° 1. -Cultivo de *Streptomyces* sp (CA-93) en 4 medios de Fermentación (A, B, E, y F) para la producción de metabolitos activos.

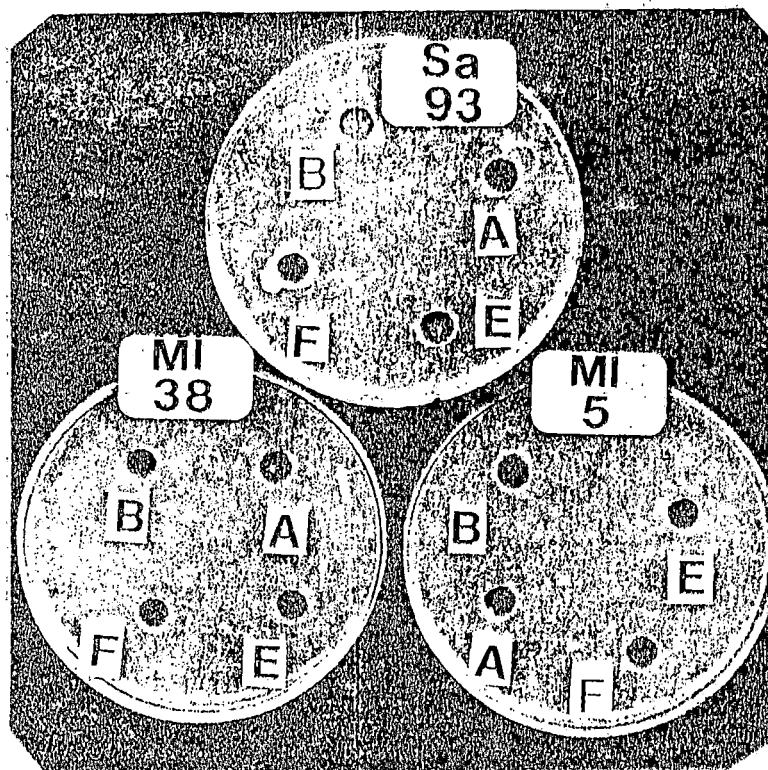


Foto N° 2. - Patrón de actividad Antibacteriana de las cepas de *Streptomyces* sp. (CA-93); (CA-38) y (CA-5) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Micrococcus luteus* ATCC 9341 en 4 medios de fermentación.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE LA TECNICA DE EXCAVACION - PLACA-CULTIVO

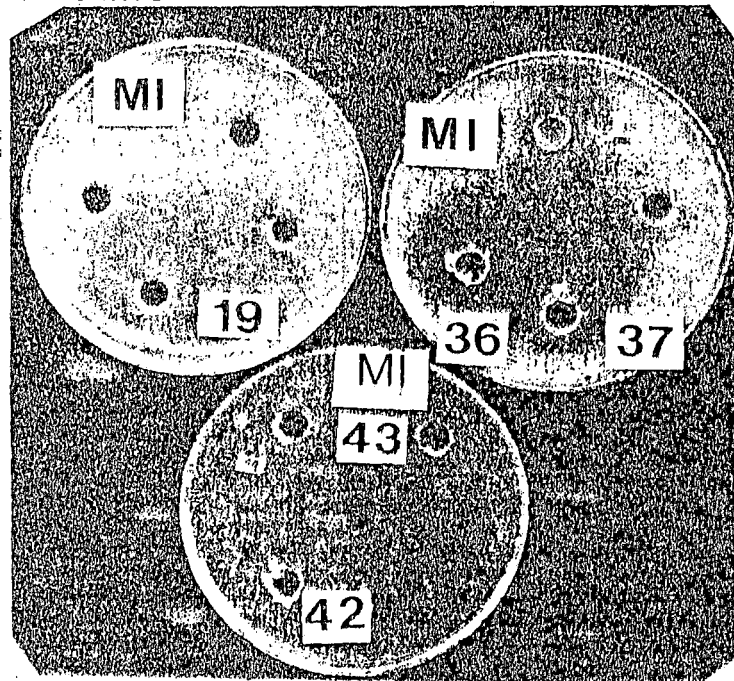


Foto N°3. - Sensibilidad de la cepa *Micrococcus luteus* ATCC 9341 frente a metabolitos activos de las cepas de *Streptomyces* sp. (CA-19); (CA-35); (CA-36); (CA-37); (CA-42); y (CA-43).

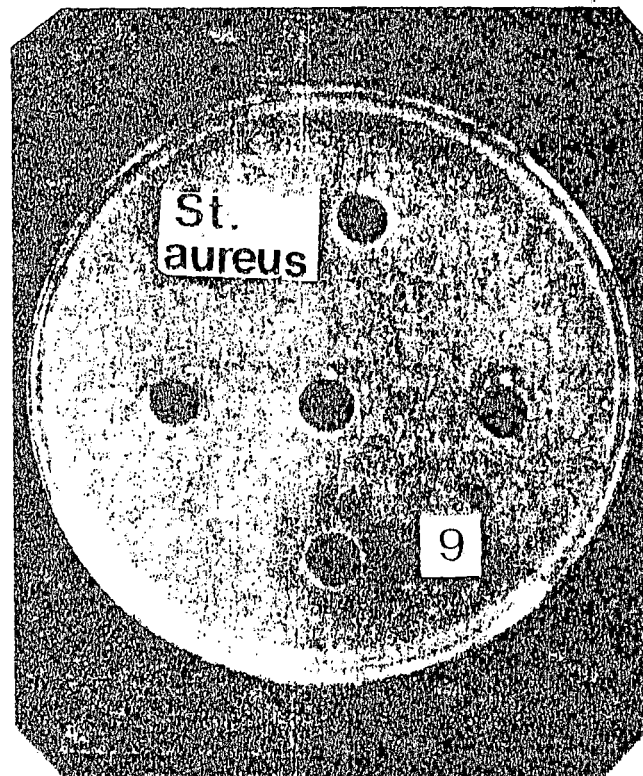


Foto N°4. - Sensibilidad de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente al metabolito activo de la cepa de *Streptomyces* sp. (CA-9)

## MORFOLOGIA MACROSCOPICA

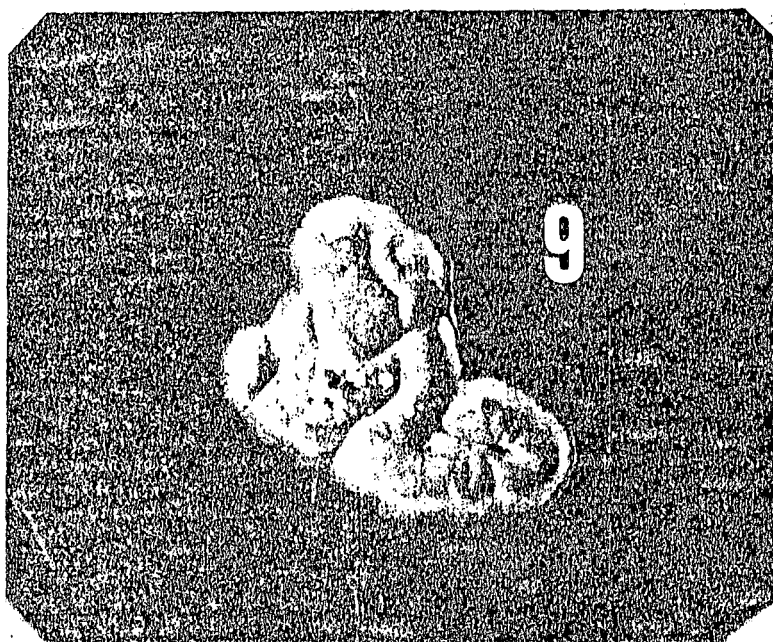


Foto N°5. - Colonia de *Streptomyces* sp. (CA-9) en agar glicerol asparagina a 28°C por 14 idas. Muestra micelio aéreo de color gris claro, superficie aterciopelada y extremos blanquecinos.

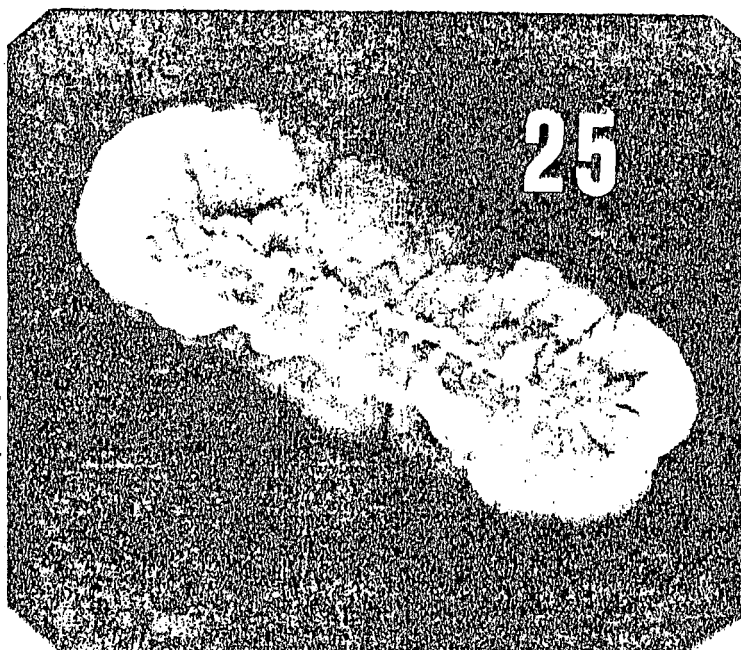


Foto N°6. - Colonia de *Streptomyces* sp (CA-25) en agar sales inorgánicas almidón a 28°C por 14 idas. Muestra micelio aéreo verde olivo, superficie algodonosa y pulverulenta con extremos blanquecinos.

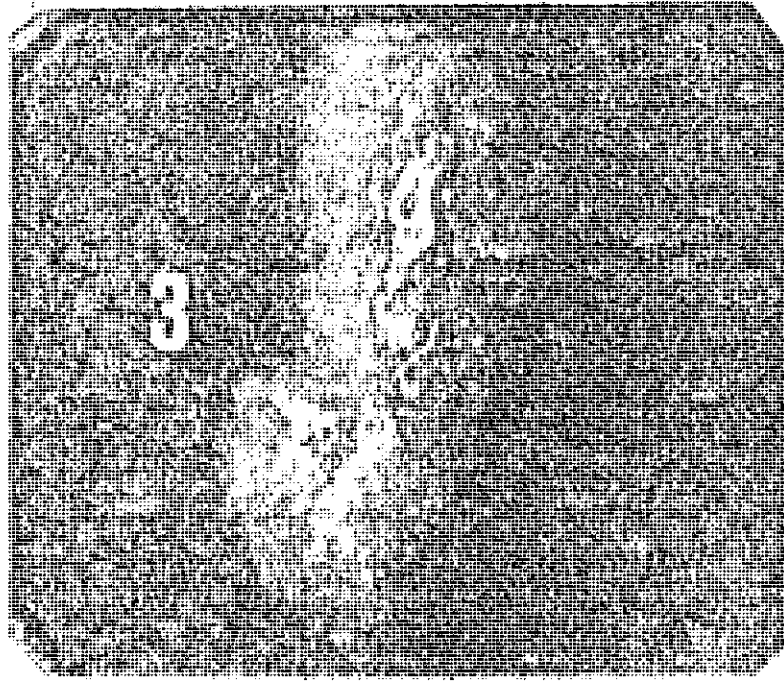


Foto N°7. -Colonia de *Streptomyces* sp (CA-03) en agar sales inorgánicas almidón a 28°C x 14 días.  
Muestra micelio aéreo de color gris claro y micelio substrato rosado con extremos crema.

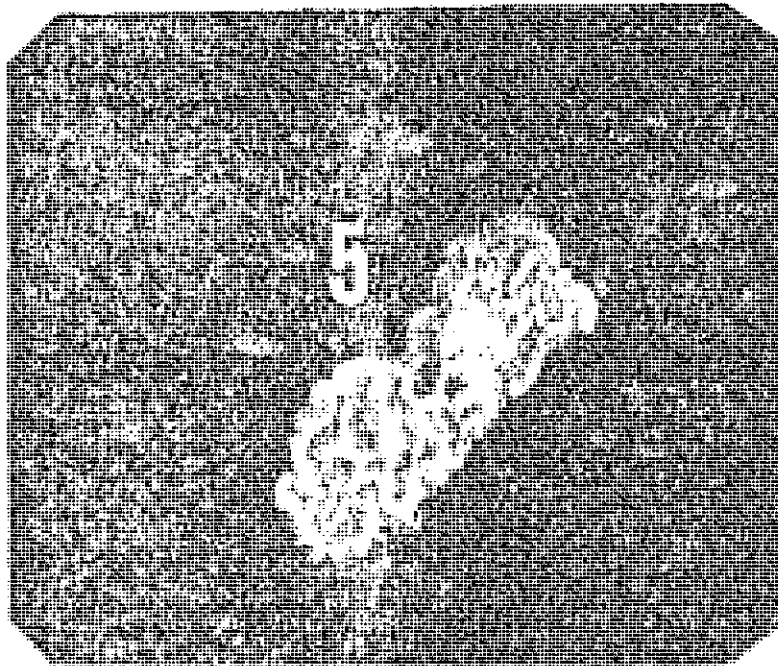


Foto N°8. -Colonia de *Streptomyces* sp (CA-05) en agar extracto de levadura-malla a 28°C x 14 días.  
Muestra micelio aéreo amarillo cremoso y micelio substrato amarillo.

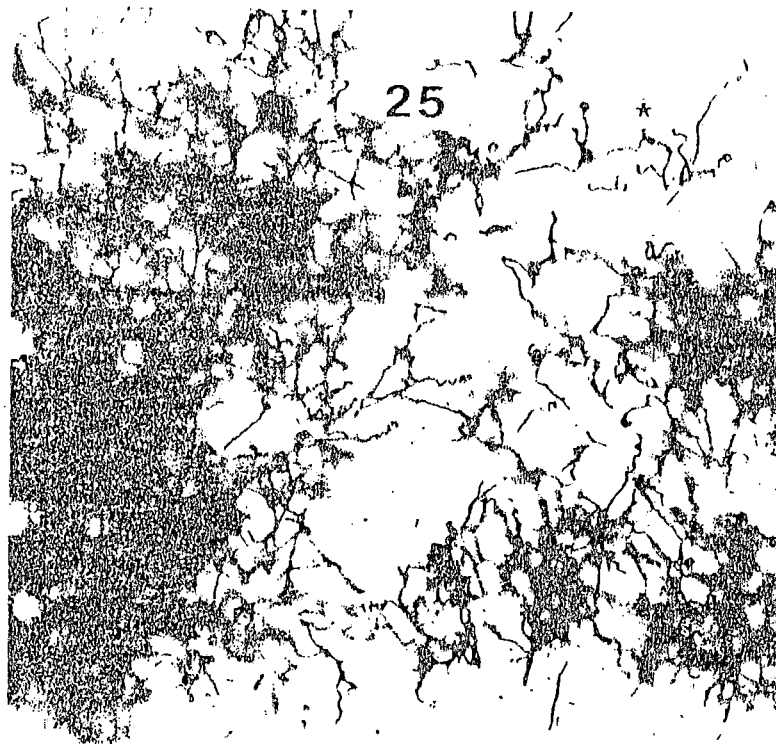


Foto N°9. -Microfotografía de *Streptomyces* sp (CA-25) cultivado en microcultivo. Se observa presencia de esporas en cadena dispuestas en espiral.

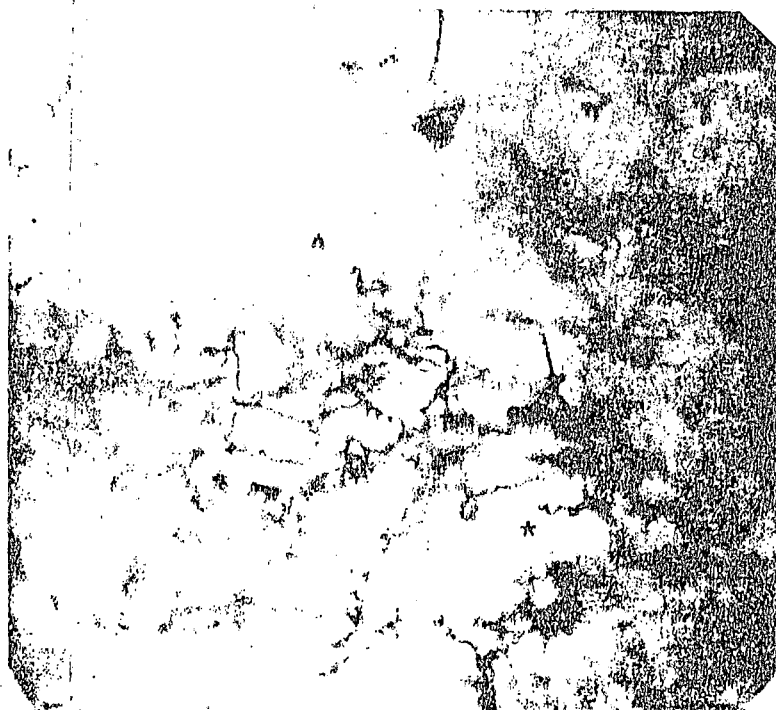


Foto N° 10. - Microfotografía de *Streptomyces* sp (CA-93) mediante observación directa del cultivo a 28°C x 14 días. Se observa presencia de esporas en cadena dispuestas en forma espiralada

## ANÁLISIS QUIMIOTAXONÓMICO

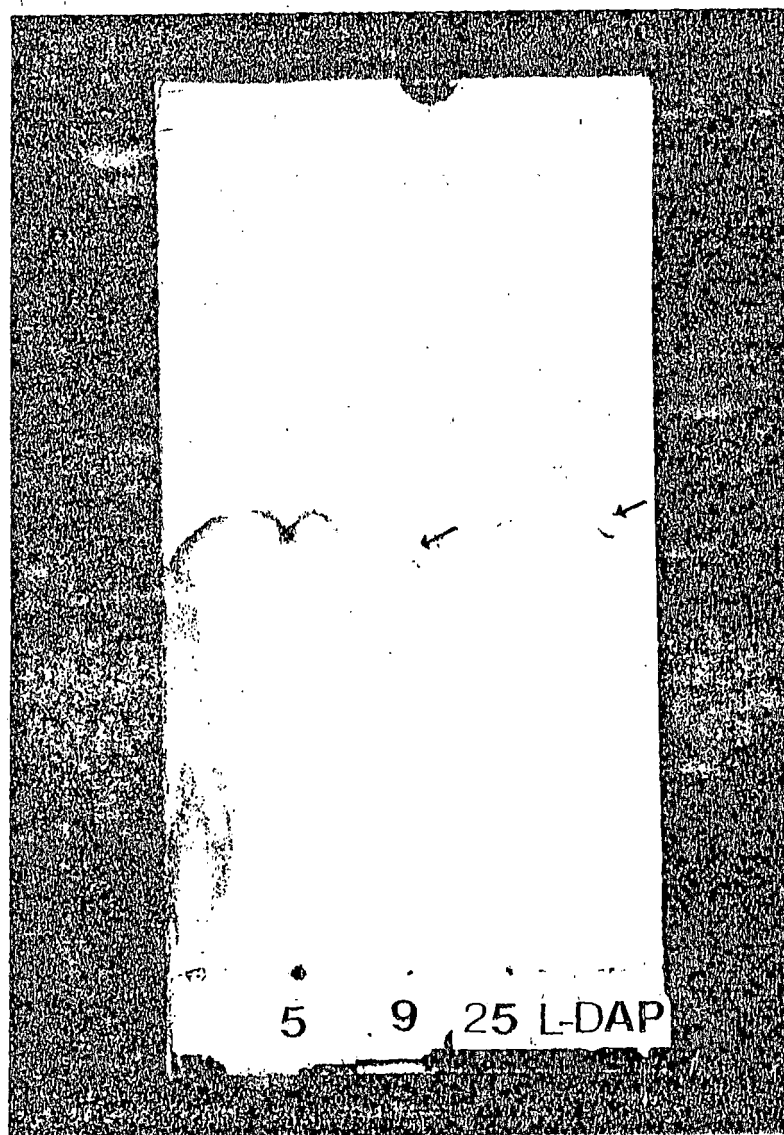


Foto N°11. - Cromatografía en capa fina para la detección del ácido L-Diaminopimélico utilizando un estándar de L-DAP.

Muestra : hidrolizado de células enteras de cepas de Actinomyces  
Soporte : silicagel GF 254  
Sma.Solventes : Metanol-piridina-HCl 6N Agua destilada  
Revelador : Ninhidrina en acetona



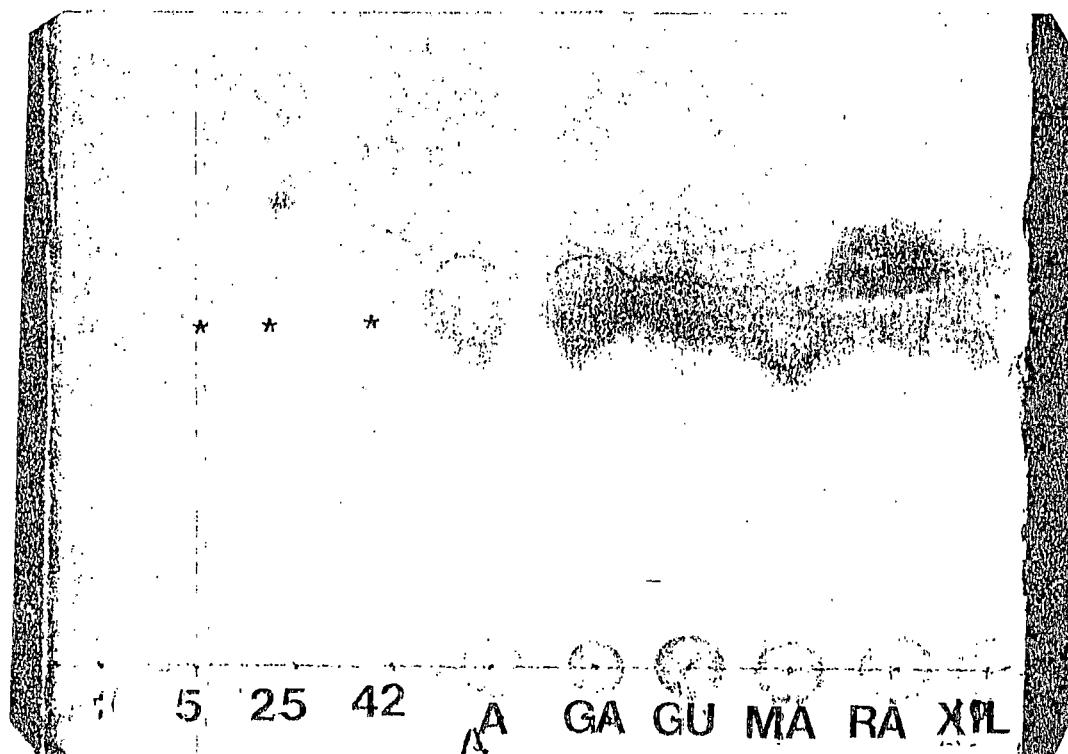


Foto N°12. - Separación de carbohidratos en hidrolizados de células enteras de Actinomycetos en cromatografía en capa fina.

Muestra : hidrolizado de células enteras de Actinomycetos

Soporte : silicagel GF 254

Solventes : N-butanol-Acido acético-agua destilada

Revelador : Talafo ácido de anilino

Estándares de azúcares:

A = arabinosa      GU = glucosa      RAM = ramnosa

GA = galactosa      MAN = manosa      XIL = xilosa

#### IV. DISCUSION

Los *Actinomyces* aeróbicos, saprofitos se mantienen como la mejor fuente de metabolitos secundarios nuevos, derivados de fermentación. El reservorio natural de los *Actinomyces* aeróbicos es el suelo, donde su rol ecológico principal parece ser la descomposición de la materia orgánica (16).

Labeda y Shearer (44) reportaron que el número de *Actinomyces* recuperables por gramo de suelo agrícola está en exceso de 10<sup>6</sup> ufc/g.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal el aislamiento de *Actinomyces* aeróbicos con capacidad para producir sustancias antibacterianas y que contienen ácido L-diaminopimélico en sus paredes celulares (16,20).

En el trabajo realizado las cepas de *Actinomyces* aislados de suelo, mostraron buen desarrollo en el medio de aislamiento primario Arginina-Glicerol-Sales (AGS), el cual por su composición en sales minerales y glicerol como la fuente principal de carbono, permitió la recuperación y el aislamiento selectivo de *Actinomyces* aeróbicos, según lo reportado por Demain y Nadine, (31); Nakeeb y Lechevalier(45).

El medio de cultivo secundario conteniendo extracto de levadura y extracto de malta, permitió la preservación de los cultivos durante un periodo de tiempo bastante largo (6 meses) durante los cuales las cepas de *Actinomyces* aislados no sufrieron cambio alguno en su comportamiento metabólico, tal como lo reportado por Okamura (30). Lo cual es un indicador del requerimiento nutricional mínimo, que presentan los *Actinomyces*.



Esta característica de los *Actinomycetos* les confiere la capacidad para producir metabolitos secundarios por cuanto en su genoma hay grandes segmentos disponibles para otras funciones diferentes al crecimiento (19).

En nuestro trabajo, la mayor prevalencia de *Actinomycetos* observados en suelos de cultivo secos y alcalinos tales como los del Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia-UNMSM y Suelos cultivados de Supe y Huaral, estuvo influenciada por la humedad, el pH y la presencia de raíces de las plantas y arboles. Sin embargo en jardines de parques donde la humedad es mayor y la presencia de arboles es mínima la población de *Actinomycetos* aislados fue menor. Tal como lo demuestran los estudios realizados por Porter, J., (46).

La población de *Actinomycetos* aislados corresponde al horizonte A debido al alto contenido de materia orgánica, aireación y menor contenido de humedad. Similar a lo reportado por Hagedorn y col. (47).

El Pre-tratamiento de las muestras de suelo reportadas en este trabajo fue efectivo para incrementar el porcentaje de *Actinomycetos*, sin el decrecimiento de la variedad de los mismos. El proceso de humedecimiento y secado de las muestras permitió reducir considerablemente la flora bacteriana acompañante compuesta principalmente de *Bacillus*, hongos y levaduras, tal como lo demuestran las investigaciones realizadas por Okamura, (32); Tresner y Hayes (48).

Durante la evaluación de la actividad antimicrobiana de los *Actinomycetos* aislados, por la prueba cualitativa de Diseminación Cruzada, se

obtuvo 53% de cepas bioactivas de un total de 100 cepas aisladas, porcentaje similar a lo reportado por Ann Horan, (19); Goodfellow y Williams, (13); Williams y Wellington, (12).

En la tabla N°1 se puede observar que el patrón de actividad de las 53 cepas bioactivas es de amplio espectro, por cuanto tienen actividad frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras. Además se puede observar que 25 cepas (48 %) son activas frente a 1 microorganismo; 5 cepas (9.6 %), frente a 2 microorganismos; 11 cepas (21.2%) frente a 3 microorganismos; 10 (19.23 %) cepas a 4 microorganismos y 1 cepa (1.92%) activa frente a 5 microorganismos. Teniendo el patrón de actividad de las 53 cepas bioactivas se selecciono 24 cepas al azar para ser evaluadas mediante cultivos líquidos sumergidos usando medios de fermentación para la producción de sustancias antibacterianas.

Utilizando 4 medios de fermentación denominados como A, B, E y F reportados por Okamura (32), los mismos que se diferencian en sus fuentes de sales, hidratos de carbono y nitrógeno, el patrón de actividad antimicrobiana determinado por el método de Difusión en Agar, con la técnica de Excavación - Placa-Cultivo mostró variación de acuerdo al medio de fermentación.

En la tabla N°2 y Fotos N 1 y 2 se pueden observar que los diámetros de las zonas de inhibición son más consistentes en los medios de fermentación E y F, esto se correlaciona con los resultados mostrados en la Tabla N°3 en donde la frecuencia de la actividad antibacteriana en el medio F es del 75% (18 cepas) para el *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; del 91.66% (22 cepas)

para el *Micrococcus luteus* ATCC 9341; del 41.66% (10 cepas) para el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y del 25% (6 cepas) para *Escherichia coli* ATCC 25922.

La variación de la actividad antibacteriana en función de la composición del medio de fermentación, nos indica que existen requerimientos especiales para la producción de sustancias antibacterianas que según Srinivassan, (10), están constituidos por la temperatura, composición del medio, adición de inductores, tiempo de incubación, pH y condiciones de oxigenación.

La producción de la sustancia antimicrobiana y el incremento de su actividad, fue influenciada por la presencia de glucosa al 1 % en el medio A-1, y el medio de fermentación F en los cuales actuó como un inductor del incremento de la biomasa, otros factores importantes fueron la temperatura de 28 C, la agitación de los cultivos a 200 RPM/min. Y el pH del medio que tuvo una variación de 6.7 a 7.0 para un tiempo óptimo de fermentación de 5 días según lo reportado por Saitoh (49); Bernan (26,27); Naruse (28); y Katsuhisa (29).

La evaluación de los medios de fermentación de composición diferente, para lograr la mayor producción del metabolito antimicrobiano, nos reveló al medio F como óptimo, dado que las zonas de inhibición obtenidas por las 24 cepas de Actinomycetos seleccionados, frente a los microorganismos de prueba, presentan diámetros comprendidos entre 20-50 mm.

En la tabla N°4 y 5, y las Fotos N 3 y 4 se pueden observar que la frecuencia de los diámetros entre 30-40 mm. Fue del 44% (8 cepas) para

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538; 40.90% (9 cepas) para *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y 10% (1 cepa) para *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Sin embargo para *Escherichia coli* ATCC 25922 se obtuvo zonas de inhibición con diámetros comprendidos entre 10-30 mm, lo que evidencia mayor actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas que a Gram negativas.

La identificación de 12 cepas que presentaron mayor actividad antibacteriana mediante el análisis Morfológico dio como resultado su clasificación dentro del Genero *Streptomyces.sp.*

Las características morfológicas que conllevan a este resultado se pueden apreciar en la tabla N°6 que muestra el comportamiento cultural en 4 diferentes medios propuestos por el International Streptomyces Project (ISP). Todas las cepas presentan micelio aéreo y micelio vegetativo. El color del micelio aéreo presento colores en tonos del blanco intenso, verdoso, a un gris claro y oscuro. El micelio vegetativo vario del color crema- blanquesino al amarillento y no presento fragmentación. Con relación a la producción de pigmentos se observo que la mayoría de cepas no producían pigmento, solo 3 cepas produjeron pigmento de color azul y marrón y 2 cepas mostraron un pigmento de tipo melanoide. (Fotos N° 5,6,7,y 8)

El análisis microscópico, mediante la técnica de microcultivos, así como la observación directa de los cultivos esporulados permitió diferenciar la forma y disposición de las esporas, determinándose que todas las cepas de *Actinomycetos* eran multiesporuladas, y dispuestas en cadenas largas con

formas espiraladas y rectas (fotos N° 9 y 10)

Estos resultados se sustentan en las investigaciones realizadas por Goofellow (13), según los cuales el grupo de *Actinomycetos* de origen terrestre, se encuentran en mayor proporción en los suelos secos, alcalinos y neutros dedicados a cultivos agrícolas o en los cuales hay presencia de praderas, principalmente si son del horizonte A, de poca profundidad y abundante materia orgánica.

La aplicación del criterio morfológico para la identificación de las cepas, si bien permitió una clasificación presuntiva dentro del Genero *Streptomyces*, no fue definitiva; por lo que se aplicó el criterio quimio-taxonomico, que en los últimos años se ha considerado de gran importancia porque proporciona información de gran valor en la clasificación e identificación de los *Actinomycetos*; tal como lo demuestra la determinación de los quimiotipos de la pared celular, mediante la identificación de los isómeros del ácido diaminopimelico (L, M) y el patrón de azúcares presentes a partir de hidrolizados de células enteras.

El análisis quimio-taxonomico, los ensayos de descomposición de fuentes de nitrógeno y la reacción de catalasa, mostraron los siguientes resultados:

Las 12 cepas con actividad antibacteriana presentaron el isómero L del ácido diaminopimelico en comparación con el Standard del L-Acido diaminopimelico (sigma), lo que indica que pertenece al quimiotipo I, como se observa en las Fotos N° 11 y 12 y la tabla N°7.

El patrón de azúcares de la pared celular, mostró una característica irregular, por cuanto algunas cepas presentaron el azúcar galactosa y la mayoría no presentaron azúcares. Por lo tanto las cepas evaluadas se calificaron como No característico según Lechevalier (14) y el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, 1989. Asimismo las reacciones de descomposición de fuentes de nitrógeno como caseína, tirosina y xantina, así como la prueba de catalasa nos permitieron confirmar que las 12 cepas seleccionadas por su actividad antibacteriana pertenecen al género *Streptomyces*.

De otro lado en nuestro afán de determinar la composición química de los metabolitos antibacterianos se selecciono 2 cepas; CA- 25 y CA-93, y ambas se sometieron a fermentación en el medio F según el procedimiento descrito anteriormente, se procedió a la extracción del metabolito activo y se realizaron ensayos de cromatografía en Silicagel con diferentes reveladores. El metabolito proveniente de la muestra CA-25 dio positivo al revelador de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 M y yodo con lo cual evidenciamos la presencia de materia orgánica, también dio positivo con el revelador de Hidroxilamina-ClFe III que nos indica la posible presencia de grupos funcionales tales como ésteres, amidas y anhídridos de ácidos carboxílicos.

El metabolito proveniente de la muestra Ca-93 dio resultados similares que el anterior, con la única diferencia de la presencia de posibles grupos epóxidos, al dar positivo con el revelador de ácido pícrico. Debido a que la absorción infrarroja está relacionada con las uniones covalentes, los

espectros que se muestran en los gráficos para ambas cepas dan información mas detallada de la presencia de grupos funcionales en nuestras muestras de ensayo.

De los resultados del IR obtenido no es posible correlacionar los máximos específicos de absorción vibracional con los grupos de átomos responsables de la absorción (50). Sin embargo comparando con los reportes de investigaciones realizadas por Ubukata, (23); Naruse N. y col. (28) y Katsuhisa (29) se encuentra algunas semejanzas con lo detectado en el espectro infrarojo de las muestras CA-25 y CA-93 en los que se halla indicios de grupos carbonados y amido-imido en las longitudes comprendidas entre 3400, 3200 y 1200, mientras en longitudes de onda de 1700 se da indicios de grupos como, aldehidos, esterres y ácidos carboxilicos, así mismo se observo la presencia de enlaces C-H (2920 cm).

Finalmente este ensayo preliminar da algunas luces de la estructura química de los metabolitos activos pero se hace necesario continuar con la investigación haciendo un escalado del proceso de fermentación a volúmenes mayores que permitan una extracción de metabolito antibacteriano al que se le pueda hacer un estudio químico mas detallado.

## V. CONCLUSIONES

1. - Los suelos del Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y de terrenos agrícolas de Huaral y Supe (Lima) constituyen un reservorio natural apropiado para el aislamiento de *Actinomycetos* productores de sustancias antibacterianas.
2. - De 100 cepas de *Actinomycetos* aislados de suelo, en el medio de cultivo Arginina-Glicerol-Sales (AGS), el 53% de ellas presentaron actividad antimicrobiana, mientras el 47% restante no-mostro actividad.
3. - De 24 cepas bioactivas seleccionadas, 18 cepas (75%) presentaron actividad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; 22 cepas (91.66%) inhibieron a *Micrococcus luteus* ATCC 9341; 10 cepas (41.66%) a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y 6 cepas (25%) inhibieron a *Escherichia coli* ATCC 25922. Esta variación de la actividad inhibitoria indica la presencia de diferentes sustancias antimicrobianas producidas por diferentes especies de *Streptomyces sp.*
4. - La identificación morfológica y quimio- taxonómica de 12 cepas de *Actinomycetos* seleccionados por presentar mayor actividad antibacteriana, indica que pertenecen al grupo de los *Streptomycetes* y corresponden al Genero ***Streptomyces sp.***



5. - El medio de fermentación F compuesto de glucosa, glicerol, extracto de levadura y  $\text{CaCO}_3$ , la temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , la agitación de 200 RPM/minuto y el tiempo de incubación de 5 días constituyen los factores óptimos para la producción de sustancias antibacterianas por 24 cepas de *Actinomycetos* seleccionados de suelo.

## VII. RECOMENDACIONES

1. - Evaluar el rendimiento de producción de las sustancias antibacterianas por las cepas de Actinomycetos seleccionadas, realizando el proceso de fermentación en biofermentadores de laboratorio.
2. - Realizar una extracción y purificación de las sustancias con actividad antibacteriana para continuar con los análisis químicos de elucidación y caracterización de su estructura química.
3. - Enviar las cepas con alto rendimiento de producción de sustancias antibacterianas a un Centro de Referencia Internacional para la identificación de la especie.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. - **LECHEVALIER, H.A. AND PINE (1977).** The Actinomycetales soil or Oxidative Actinomycetes In: Laskin, Allen I. And Lechevalier, Hubert (eds). Handbook of Microbiology. 2nd ed. Vol. I Ed. CRS Press.
2. - **BROCK, T.D.; SMITH, D.W. Y MADIGAN, M(1987).** Microbiología 4ta ed. Prentice-hall Hispanoamericana S.A. México. Pag.806-9
3. - **KALAKOUTSKII, L.V.; AGRE, NINA Y COLS. (1976).** Comparative aspects of Development and Differentiation in Actinomyces. Bacteriological Review 40(2): 469-524.
4. - **MC CANN, PAMELA. (1981).** Endogenous factors involved in aerial Mycelium formation in Actinomycetes. In : Schlessinger, David. Microbiology. Whashington. Ed. American Society For Microbiology. Pp. 348-352.
5. - **LECHEVALIER, H.A.(1989).** A practical guide to generic identification of Actinomyces. In: Williams, S.T.; Sharpe, M.E. and Holt, J. (Ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 4. The Williams & Williams Co. Baltimore. USA pp 2344-2347.
6. - **RIPPON, JHON WILLARD. (1990).** Tratado de Micología Medica: Hongos y Actinomicetos patógenos. 3ra. ed México. Ed.Interamericana Mc Graw-Hill pp 17-22
7. - **JOKLIK, WOLFGANG K.; WILLET, HILDA P.(1994).** Zinsser Microbiología. 20ava edición. Argentina. Editorial Medica Panamericana Págs. 722-732

8. - **AGRE, N.S.; L.A. DOROKHOVA. (1972).** Fine structure of reproductive structures of Actinomycetes in the systematics of these organisms. Zh. Obshch. Biol. 33: 176-186
9. - **AGRE, N.S.; I.P. KIRILLOVA. (1972).** Espore germination in thermophilic actinomycetes. I. Preliminary observation with thermoactinomycetes vulgaris and Actinobifida dichotomica. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde Hygiene Abt. 2 127: 525-538
10. - **SRINIVASAN, M.C.; LAXMAN, R.S. and DESHPANDE, M.V.(1991).** Physiology and nutritional aspects of actinomycetes; an overview. World of Journal of Microbiology and Biotechnology 7: 171-184.
11. - **KUSTER, E.(1976).** Ecology and predominance of soil Streptomyces pp. 109-121. T. Arai Ed. Actinomycetes the boundary microorganisms. Toppan Co. Ltd. Tokio.
12. - **WILLIAMS, ST. ;LANNING, S. and WELLINGTON, M(1984).** Ecology of Actinomycetes, pp 481-528. In : M. Goodfellow, M.Morarsk, S. Williams. (Ed), The Biology of the Actinomycetes. Academic Press Great Britain.
13. - **WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M(1983).** Numerical classification of Streptomyces and related genera. Journal of General Microbiology 129: 1743-1813
14. - **LECHEVALIER, M; LECHEVALIER, H.(1970).** Chemical composition as a criterion in the Classification of aerobic Actinomycetes. International Journal Systematic Bacteriology. 20: 435-443
15. - **STANECK, J.L and ROBERTS, G.O.(1974).** Simplified Approach to

- identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology* 28: 226-230
16. - **LECHEVALIER, H.L. and LECHEVALIER, M.P.(1981).** In the *Procaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, vol II, 1st ed. (starr, MP: , Stolp, Traper,H.G.,Balows A., and Schlegel, H.G.,eds),pp315-358
  17. - **WAKSMAN AND WOODRUFF. (1940).** En *El Impacto de los Antibióticos*. Ed. Univ. Salamanca 1985.pp 9-15.
  18. - **MARTIN, J.F.; LIRAS, P. y AGUILAR, A.(1986).** Producción de antibióticos. En: *la Ingeniería Genética y sus Aplicaciones*. (Por Pellon, J.) Ed. Acribia S.A. España. Pp 237-239.
  19. - **HORAN ANN, C. (1994).** Aerobic Actinomycetes: a continuing source of novel natural Products. *Biotechnology* 26: 3-30
  20. - **LECHEVALIER, M.P. and LECHEVALIER, H.A.(1985).** In *Biology of Industrial Microorganisms* (Demain,A.L. and Solomon, N.A. eds) pp 315-358 , Benjamin/Cummins,Menlo Parck C.A.
  21. - **LUEDEMANN, G.M.(1991).** Actinomycetes 2 (Suppl, 1) *Trans. N.Y.Acad. Sci.* 33:1-49
  22. - **P.C. LEE and C.C. HO. (1996).** Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. *World journal of Microbiology & Biotechnology* 12:73-75.
  23. - **UBUKATA, H.; SHIRAISH, N. and SHEN, Y.C.(1995).** RS-224,Band C: New Macrolide antibiotics from *Streptomyces violaceusniger*. *Journal of*

- antibiotics Tokio 48(4): 289-292.
24. - **HACENE, H.; SABAOU, N; BOUNAGA, N.(1994).** Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. Microbios. 79(319): 81-85
  25. - **FIEDLER, H.P.; KULIK, A.; SCHUZ, T.C.(1994).** Byosyntethic capacities of Actinomycetes. Juglomycin Z, a New naphthoquinone antibiotic from Streptomyces. Journal Antibiotic Tokio 47(10): 1116-112.
  26. - **BERNAN, VALERIE; MONTENEGRO, DEBORAH. (1994).** Martinomycin, a New polyether antibiotic produced by Streptomyces salvialis. I. Taxonomy, fermentation and biological activity. The Journal of Antibiotics 47(12): 1434-1441.
  27. - **BERNAN, VALERIE; MONTENEGRO, DEBORAH. (1994).**  
 Bioxalomycins, New antibiotics produced by the marine Streptomyces sp. LL-31F508: taxonomy and fermentation.  
 The Journal of Antibiotics 47(12): 1417-1424.
  28. - **NARUSE, N.O.; TENMYO, S. & Cols. (1993).**  
 New antiviral antibiotics, kistamicins A and B.  
 I.Taxonomy,production,isolation,physico-chemical properties and biological activitys. The Journal of antibiotics 46(12): 1805-1811.
  29. - **KATSUHISA, K.; NAKAJIMA, S.(1993).** A New antitumor substance, BE-18591,produced by a Streptomycete. I.Fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. The journal of antibiotics 46(12): 1799-1803

30. - **SHIOZAWA, H.; KAGASAKI, T. & Cols. (1993).** Thiomarinol, a New hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. The journal of antibiotics 46(12): 1834-1841
31. - **KATSUHISA, K.; NAKAJIMA, S.(1992).** A New macrocyclic lactam antibiotic BE-14106 - Taxonomy, Isolation, Biological Activity and Structural elucidation. The Journal of antibiotics 45(6): 868-874.
32. - **OKAMURA, K.; KOKI, A.; SAKAMOTO, M(1979).** Microorganisms Producing a New B-Lactam Antibiotic. Journal of Fermentation Technology 57(4): 265-272
33. - **DEMAIN, A.L. AND NADINE, A.(1986).** Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology Washington, D.C. Pagas. 3-24
- 34.- **TAKIZAWA, M; COLWELL, R. and HILL, R.(1993).** isolation and diversity of Actinomycetes inthe Chesapeake Bay. Applied and Enviromental Microbiology 59(4): 997-1002
35. - **WUITE, RICHARD AND GREENTEN, M (1986).** In screening for New Products from microorganisms (Demain and Nadine eds) pp 24-27 , American Society for Microbiology Washington D.C.
36. - **LOCCI, R. 1984.** Streptomyces ad related genera, pp 2541-2508 In: Williams St. ;Sharpe, M and Holt, J. (Ed). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4, Baltimore USA. Williams & Williams Co.
37. - **LECHEVALIER, M 1968.** Identification of Aerobic Actinomycetes of Clinical

Importance. Journal Laboratory & Clinical Medic. 71: 931-943

38. - **SCHAAL, K.P. 1983.** Identification of Clinically significant Actinomycetes and Relates Bacteria using Chemical Techniques In: Goodfellow, M (Ed) Chemical Methods in Bacterial Sistemics USA.
39. - **KWON-CHUNG, PH. D.; BENNETT, M.D. (1992).** Medical Micology. Ed.Lea and Febiger. pp 81-100-582-589
40. - **RANDERATH, KURT. (1989).** Cromatografía en capa fina. 2da. Edición Barcelona. Ed.Urmo.
41. - **ERTEL, H.; HORNER, L. (1972).** Cromatografic journal 1962(7): 268. En E.Merck. Reactivos de coloracion para cromatografia en capa fina y papel. Darmtadt Alemania.
42. - **WHITTAKER, V.P.; WIJESUNDEN, S.(1972).** Biochemistry journal. 1952(51): 348. En E. Merck. Reactivos de coloracion para cromatografia en capa Fina y Papel. Darmstadt Alemania.
43. - **FIORITI, J.A.; SIMS, R.J.Cromatographic journal. 1968: (32)761.** En E.Merck Reactivos Merck. Rectivos de coloracion para Cromatografia en Capa Fina y Papel. Darmstadt Alemania 1972.
44. - **LABEDA, D.P., AMD SHEARER, M.C. (1990).** In Isolation of Biotechnological Organisms fron Nature (Labeda,D.P.,ed) pp.1-19 Mc Graw-Hill New York.
45. - **NAKEEB, M.A. and LECHEVALIER, M.A.(1963).** Slective isolation of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol 11:75-77
46. - **PORTER, J.N.(1971).** Prevalece and distribution of antibiotic- producing actinomycetes. Advan. Appl Microbiol 14: 73-92



47. - **HAGEDORN CHARLES. (1976).** Influences of soil Acidity on Streptomyces Populations Inhabiting forest soils. Appl. And Env. Microbiol. 32(3): 368-375
48. - **TRESNER, H.D. AND HAYES J.A.(1970).** Improved Methodology for isolating soil microorganisms: Appl. Microbiol. 11:75-77
49. - **SAITOH, K.; FURUMAI, T. (1995).** Pradimicin S, a New pradimicin analog. III. Application of the frit-FAB LC/MS technique to the elucidation of the pradimicin S biosynthetic pathway. Journal Antibiotic Tokio 48(2): 162-168
50. - **MORRIL, T.; SILVERTEIN, M; CLAYTON, B.G. (1991).** Spectrometric identification of organic compounds. Fifth Edition. Singapur Jhon Wily & Son INC. pp 105-123

## VIII ANEXOS

### PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

#### MEDIO DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO

#### ARGININA-GLICEROL SALES AGAR (AGS)

##### Composición:

L-Arginina HCl	1.00 g
Glicerol (gravedad específica no menor que 1249 a 25°C)	12.50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g
NaCl	1.00 g
Mgso <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.50 g
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.01 g
Cuso <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.001 g
Znso <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.001 g
Mnso <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.001 g
Agar (DIFCO)	15.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

##### Preparación:

Suspender los ingredientes en agua destilada, calentar hasta disolución completa.

Ajustar el pH a 6.9-7.1, luego autoclavar por 15 minutos a 121°C.

## **MEDIO DE CULTIVO PARA PURIFICACION Y CONSERVACION DE CEPAS**

### **EXTRACTO DE MALTA-LEVADURA AGAR**

#### Composición:

Extracto de Malta (DIFCO)	4.00 g
Extracto de Levadura (DIFCO)	4.00 g
Dextrosa (DIFCO)	4.00 g
Agar (DIFCO)	20.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

Preparación: Suspender todos los ingredientes en el agua destilada y calentar hasta disolución completa. Luego ajustar el pH a 7.0 y autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

## **MEDIOS DE CULTIVO DE FERMENTACION**

### **MEDIO A-1 PARA OBTENCION DE INOCULO**

#### Composición : w/v

Glucosa	1%
CaCO <sub>3</sub>	1%
Dextrina	2%
Extracto de Levadura	0.5%
Asparagina	0.8%

#### Preparación:

Suspender los ingredientes en agua destilada, calentar hasta completa disolución y luego ajustar el pH a 7.2. Autoclavar a 115°C por 15 minutos.

#### **MEDIO DE FERMENTACION A**

##### Composición:

	w/v%
Dextrina	5.00 g
Melaza de caña	2.00 g
Harina de soya	4.00 g
Cl	0.10 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.13 g
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (ug/ml)	1.30
Agua destilada	100 ml
	pH 6.8

##### Preparación:

Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada, calentar hasta completa disolución, enfriar y ajustar el pH a 6.8 y luego esterilizar por autoclave a 15 Lb, 121°C por 15 minutos.

#### **MEDIO DE FERMENTACION B**

##### Composición :

	w/v%
Glucosa	0.50 g
Almidón soluble	3.00 g

Harina de soya	3.00 g
Corn steep liquor	0.50 g
CaCO <sub>3</sub>	0.70 g
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O (ug/ml)	1.30
Agua destilada	100 ml
	pH 8.0

Preparación:

Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada, calentar hasta completa disolución, ajustar el pH y finalmente esterilizar por autoclave a 121 °C ,15 Lb por 15 minutos.

**MEDIO DE FERMENTACION E**

Composición:

	w/v%
Glicerol	0.50 g
Almidón soluble	2.00 g
Harina de soya	2.00 g
Peptona	0.30 g
NaCl	0.30 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.05 g
Cl	0.05 g
NaNO <sub>3</sub>	0.20 g
Agua destilada	100 ml
	pH 6.8

Preparación:

Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada, calentar hasta disolución completa, ajustar el pH y luego esterilizar por autoclave a 121°C, 15 Lb por 15 minutos.

**MEDIO DE FERMENTACION F**

Composición :

	w/v%
Glucosa	2.00 g
Glicerol	4.00 g
Almidón de papa	0.20 g
Harina de soya	0.50 g
peptona	0.50 g
Extracto de levadura	0.50 g
NaCl	0.50 g
CaCO <sub>3</sub>	0.20 g
Agua destilada	100 m l
	pH 6.8

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar hasta disolución completa, ajustar el pH y luego esterilizar por autoclave a 121°C, 15Lb por 15 minutos.

## **MEDIOS PARA ANALISIS MORFOLOGICO**

### **AGAR GLICEROL ASPARAGINA**

#### Composición:

Asparagina	1.00 g
Glicerol (grav, esp. no menos 1.249 a 25°C)	12.50 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g
NaCl	1.00 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.50 g
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.001 g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.001 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.001 g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.001 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: disolver los ingredientes por calentamiento, ajustar el pH a 6.9-7.1.

Autoclavar 121°C, 15Lb x 15 minutos.

### **AGAR ALMIDON SALES INORGANICAS**

#### Composición:

Almidón soluble	10.00 g
Caseina libre de vitaminas(DIFCO)	0.30 g
KNO <sub>3</sub>	2.00 g

NaCl	2.00 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.00 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05 g
CaCO <sub>3</sub>	0.02 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Agar	18.00 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Suspender los ingredientes en agua destilada, calentar hasta completa disolución, ajustar el pH a 7.0-7.2 y luego esterilizar por autoclave a 121°C, 15Lb por 15 minutos.

**REACTIVOS PARA CROMATOGRAFIA**

**Reactivo de Ninhidrina en Acetona 0.1% (Revelador de Aminoácidos)**

Ninhidrina 0.10 g

Acetona 100 ml

**Reactivo Talato Acido de Anilinio (Revelador de Carbohidratos)**

Acido Talico 3.25 g

Anilina 2.00 ml

agua saturada con n-Butanol 100.00 ml



Cuadro 1 : Actinomicetales : Actinomycetos nocardiformes y grupos relacionados

Familia	Género
1. Actinomycetaceae	Actinomyces (Hartz 1877) Arachnia (Pine y George 1969) Bacterionema (Gilmour, Howell y Biddv, 1961) Bifidiobacterium (Orla Jensen 1927) Rothia (Georg y Brown 1967)
2. Micropolysporaceae	øerskovia (Prauser, Lechevalier y Lechevalier 1970) Promicromonospora (Krasilnikov y Kirillova 1961)
3. Dermatophilaceae	Saccharopolyspora (Lacey y Goodfellow 1975) Micropolyspora (Lechevalier, Solotorsky 1961) Dermatophilus (Van Saceghem 1915) Geodermatophilus (Luederman 1968)
4. Frankiaceae	Frankia (Brunchorst 1886)
5. Nocardiaceae	Nocardia (Trevisan 1889) Rhodococcus (Zopf 1891) Corynebacterium (Lehman y Neumann 1896)
6. Thermonosporaceae	Thermonosporas (Hanssan 1957) Saccharomonospora Nocardiopsis (Meyer 1976)
7. Maduramycetaceae	Actinomadura (Lechevalier y Lechevalier 1910) Microbiospora (Nonomura y O'Hara 1957) Microtetraspora
8. Streptomycetaceae*	Streptomycetes (Waksman y Henrici 1843) Intrasporangium (Kalakoutsii, Kirillova 1967) Nocardioides (Prauser 1976)

\* Por lo regular, forman micelio no fragmentado.

8.

Cuadro 2 : Constituyentes de la pared celular en relación con la Taxonomía\*

POSICIÓN DE LA PARED	COMPONENTES PRINCIPALES EN LA PARED	TIPO CELULAR COMPLETO (COMPONENTE PRINCIPAL)	GENERO
I	LL - DAP <sup>(1)</sup> glicina	glicina	Streptomyces Nocardioide
II	meso - DAP glicina	xilosa	Micromonospora
III	meso - DAP	arabinosa madurosa <sup>(2)</sup>	Actinomadura Dermatophilus Microbiospora
IV	meso - DAP	galactosa ninguno ninguno arabinosa galactosa	Nocardiosis Thermoactinomyces Geodermatophilus Nocardia Rhodococcus Corynebacterium Mycobacterium
V	Lisina, Ornitina	Acido aspártico	Actinomyces
VI	Lisina, ácido aspártico, galactosa		Pherskovia

\*De Hecht S., y Causey W., 1976, J. Clin. Microbiol., 4:284 - 287

(1) DAP = ácido diaminopimélico.

(2) 2-0-metil-D-galactosa.

+

### Cuadro 3 : Clasificación de los Actinomycetos\*

#### ORDEN I : ACTINOMICETOS

##### Familia I : Actinomycetaceae

- Género I : Actinomyces
- Género II : Arachia
- Género III : Bifidobacterium
- Género IV : Bacterionema
- Género V : Rothia

##### Familia II : Mycobacteriaceae

- Género I : Mycobacterium

##### Familia III : Frankiaceae

- Género I : Frankia

##### Familia IV : Actinoplanaceae

- Género I : Actinoplanes
- Género II : Spirillospora
- Género III : Streptosporangium
- Género IV : Amphosporangium
- Género V : Ampullariella
- Género VI : Pilimelia
- Género VII : Planomonospora
- Género VIII : Planohispora
- Género IX : Dactylosporangium
- Género X : Kitasatoa

##### Familia V : Dermatophilaceae

- Género I : Dermatophilus
- Género II : Geodermatophilus

##### Familia VI : Norcardiaceae

- Género I : Nocardia
- Género II : Pseudonocardia

##### Familia VII : Streptomycetaceae

- Género I : Streptomyces
- Género II : Streptoverticillium
- Género III : Sporichthya
- Género IV : Microellobospora

##### Familia VIII : Micromonosporaceae

- Género I : Micromonospora
- Género II : Thermoactinomyces
- Género III : Actinobifida
- Género IV : Thermonospora
- Género V : Microbiospora
- Género VI : Micropolyspora

---

\* Sección 17 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 4

Cuadro 4 : Componentes principales en las preparaciones de paredes celulares de los Actinomicetos mas importantes

Tipo de pared celular	Lisina	Ornitina	Acido as- pártico	Glicina	L-DAP*	meso - DAP	Arabinosa	Galactosa	Necesidades de O <sub>2</sub>
I. Streptomyces				+	+				
II. Microspora Actinoplanes				+		+			
III. Streptosporangium Dermatophilus Thermoactinomyces Microbiospora Actinomadura **						+			Metabolismo oxidativo; generalmente se en- cuentra en el suelo
IV. Nocardia Micobacterium						+	+	+	
V. Actinomyces (tipo israelii)	+	+							Metabolismo fermentati- vo; generalmente aso- ciado a animales
VI. Actinomyces (tipo bovis)	+		+						

\* DAP = ácido 2,6 - diaminopimélico.

\*\* Anteriormente llamada Nocardia (tipo madurae)

Todas las preparaciones contienen cantidades importantes de glucosamina, ácido murámico, alanina y ácido glutámico.

CUADRO Nº5.- Novel Secondary Metabolites Reported in The Journal of Antibiotics by Therapeutic Area, 1986 versus 1991

Therapeutic Area	1986	1991	Percent Change
Anti-infectives	25	19	-24
Tumor biology	14	18	+28
Pharmacology	15	28	+87
TOTAL	54	65	+20

FUENTE: HORAN ANN,C. (1994) . Biotechnology 26:pp. 4

CUADRO Nº 6.- Novel Secondary Metabolites Reported in The Journal of Antibiotics by Producing Organism 1986 versus 1991

Producing Organism	1986	Percent Total	1991	Percent Total
Actinomycetes	47	87	51	78
Fungi	7	13	14	22
TOTAL	54	100	65	100

FUENTE : HORAN ANN,C. (1994). Biotechnology 26: pp. 4